

(19)



Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets



(11)

**EP 0 976 414 A2**

(12)

## **EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG**

(43) Veröffentlichungstag:

**02.02.2000 Patentblatt 2000/05**

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>: **A61M 1/38**

(21) Anmeldenummer: **99104790.3**

(22) Anmeldetag: **10.03.1999**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU  
MC NL PT SE**

Benannte Erstreckungsstaaten:

**AL LT LV MK RO SI**

(30) Priorität: **10.03.1998 DE 19810195**

(71) Anmelder:

**Salinger, Reinhard Dr. med.  
90542 Eckental (DE)**

(72) Erfinder:

**Salinger, Reinhard Dr. med.  
90542 Eckental (DE)**

(74) Vertreter:

**Schneck, Herbert, Dipl.-Phys., Dr. et al  
Rau, Schneck & Hübner  
Patentanwälte  
Königstrasse 2  
90402 Nürnberg (DE)**

(54) **Verfahren und Vorrichtung zur Sammlung und Weiterverarbeitung von spezifischen Blutkomponenten bei kontinuierlichen laminaren Strömungsverhältnissen**

(57) Bei einem Verfahren zur Sammlung von spezifischen Blutkomponenten bei kontinuierlichen, laminaren Strömungsverhältnissen, wobei dem Patienten mittels einer ersten Leitung Blut entnommen und einer der Separation der Blutkomponenten dienenden Zentrifuge zugeführt und über eine Rückführleitung dem Patienten Blut mit der Entnahme-Zuflußrate zurückgeführt wird, wobei die Separation bestimmt wird durch den Geometriefaktor der Zentrifuge, durch die Rotationsgeschwindigkeit der Zentrifuge und die Positionierung der Entnahmeleitung an der Zentrifuge, und wobei charakteristisch für die Separation einzelner bestimmter Blutkomponenten ein Trennungsoptimierungskoeffizient  $T_{OK}$  ist, ist vorgesehen, daß zur Sammlung von Blutstammzellen bzw. mononuklearen Zellen der Trennungsoptimierungskoeffizient  $T_{OK}$  zwischen 140 und 190, vorzugsweise bei ca. 176 liegt, und/oder daß bei Sammlung von Thrombozyten bei Blutflußgeschwindigkeiten zwischen 30 und 100 ml/min der Trennungsoptimierungskoeffizient zwischen 600 und 700, vorzugsweise bei ca. 649 liegt.

## Beschreibung

[0001] Die Erfindung richtet sich auf eine Vorrichtung gemäß dem Oberbegriff von Anspruch 1, wie sie beispielsweise aus DE 38 28 120 C2, DE 38 28 618 C2 und EP 0 654 277 A1 bekannt ist.

[0002] Für die semiquantitative Sammlung von spezifischen Blutkomponenten, Thrombozyten, Monozyten bzw. dendritischer Zellen oder peripheren Blutstammzellen (CD34+-Zellen) bzw. Sammlung der genannten Zellen aus Knochenmarksblut werden Apheresesysteme auf der Grundlage der Zentrifugalmethode genutzt. Die physikalischen Eigenschaften einer Zentrifuge werden zur Trennung von Blutkomponenten aus zweierlei Gründen eingesetzt, einmal um die Sedimentationsgeschwindigkeit von „Makromolekülen“ in den Bereich der Messbarkeit [Konzentrierung] anzuheben und zum anderen um eine gute Trennung der entsprechenden Komponenten des Gemisches (Blut) zu erreichen. Beides ist möglich, weil anstelle der Schwerkraft die ganz wesentlich vergrößerte Zentrifugalkraft ausgenutzt werden kann. Die größte Bedeutung hat die Zentrifuge wegen der deutlich vergrößerten Sedimentationsgeschwindigkeit. Grundsätzlich erhält man aber keine völlig scharfe Trennung der Komponenten, sondern für jede Komponente kommt es zu einer Verteilung der Anzahldichte, die stets ihr Maximum beim größtmöglichen Abstand von der Drehachse hat. Dabei ist zu berücksichtigen, daß das Optimum für die Sammlung die jeweiligen Komponenten in einem ausgewogenen Verhältnis der Abstände Sedimentationsgeschwindigkeiten, ihrer Anzahldichten sowie der Kompressibilität der Komponenten abhängt. Inkompressible Medien, wie Blut, haben eine konstante Dichte. Um eine gute Trennung der genannten Blutkomponenten des Blutgemisches zu erreichen sind folgende Punkte zu berücksichtigen:

aa) Handelt es sich bei der eingesetzten Methode um ein kontinuierliches oder diskontinuierliches Verfahren.

ab) Bei kontinuierlichen Verfahren wird das Blutkomponenten-Gemisch mit einer vorher definierten Geschwindigkeit ml/min einer Person oder einem Knochenmarksblut-Sammelbeutel, mittels eines Katheders (zentral oder peripher) oder durch Konnektierung des Knochenmarksblut-Sammelbeutels mit dem sterilen Apherese-Schlauchsystem entnommen und der Zentrifugen - Apheresemaschine zugeführt. Innerhalb der Apheresemaschine wird das Zellkomponenten-Gemisch den zur Trennung der Komponenten notwendigen biologisch-physikalischen Gesetzen unterzogen und dem Spender/Knochenmarksblut-Sammelbeutel über einen Rückführungsschlauch mit der gleichen Entnahme-Volumen-Geschwindigkeit ml/min zurückgeführt. In der Apheresemaschinen-Trennkammer herrschen folglich die gleichen Geschwindigkeiten.

b) Herrschen während des Trennvorganges laminare oder turbulente Strömungsverhältnisse vor. Nur auf das laminare Strömen von Flüssigkeiten mit konstanter Viskosität kann das Gesetz, von Hagen — Poiseuille angewendet werden. Es ist deshalb notwendig zuerst zu klären ob laminare Strömungsverhältnisse während des Trennvorganges vorherrschen. Für diese Klärung hilft die Reynolds-Zahl  $Re$ .

### c) Definition der Reynolds-Zahl $Re$

Wenn die Strömungsgeschwindigkeit einer Flüssigkeit eine gewisse Grenze überschreitet, dann geht die laminare Strömung in eine turbulente Strömung über. Diese kritische Geschwindigkeit hängt von der Dichte und der Viskosität der Flüssigkeit sowie vom „Radius“ der Röhre ab. Eine wichtige Kennzahl zur Charakterisierung von Flüssigkeitsströmen ist die Reynolds-Zahl  $Re$ , die durch

$$Re = \frac{2r\sigma v}{\eta}$$

definiert ist, wobei  $v$  die mittlere Strömungsgeschwindigkeit der Flüssigkeit ist. Experimente haben gezeigt, daß die Strömung von Flüssigkeiten mit einer Reynold-Zahl von bis zu 2000 laminar und für Werte über 3000 turbulent ist. Für Werte zwischen diesen beiden Grenzen ist die Strömung instabil und kann von einem Typ in den anderen übergehen.

$$Re = \frac{2 \cdot (...m) \cdot (1060 \text{ kg/m}^3) \cdot m/s}{4 \cdot 10^{-3} \text{ Pa} \cdot s}$$

d) Reynoldsche Zahlen von Blut in Abhängigkeit def. Strömungsgesch. und ...

## EP 0 976 414 A2

Tabelle 1

GBV	v = m/s	Re	GBV	v = m/s	Re
ml/min			ml/min		
174	0,01465	61	92	0,00774	32
164	0,01379	58	82	0,00689	29
154	0,01295	54	72	0,00605	25
144	0,01211	51	62	0,00521	22
133	0,01118	47	51	0,00429	18
123	0,01034	43	41	0,00345	14
113	0,00950	40	31	0,00261	11
103	0,00866	36			

Zum Vergleich: die Strömungsgeschwindigkeit des Blutes beim Ausstoß aus der linken Herzkammer (bei 75ml pro Kontraktion) in die Aorta beträgt ca.  $v = 1$  m/s, d.h. eine  $Re = 5000$ . Die Strömung in der Aorta ist somit eher turbulent.

Tabelle 2

Reynoldssche Zahlen der einzelnen zellulären Blutkomponenten						
GBV ml/min	Thrombo	Lympho	CD34+	Mono	PNC	Ery
154	53	54	54	54	56	56
144	50	50	51	51	52	52
133	46	47	47	47	48	48
123	42	43	43	43	44	45
113	39	40	40	40	41	41
103	36	36	36	36	37	37
92	32	32	32	32	33	33
82	28	29	29	29	30	30
72	25	25	25	25	26	26
62	21	22	22	22	22	23
51	18	18	18	18	18	19
41	14	14	14	14	15	15

### e) Gesetz von Hagen — Poiseuille

Bedeutung des von Hagen-Poiseuillen Gesetzes für Blut.

$$\delta p = \frac{8\eta}{r\pi^4} V$$

Blut ist eine komplexe Flüssigkeit bestehend aus festen Bestandteilen mit verschiedenen Formen, die im Blutplasma suspendiert sind. Die roten, scheibenförmigen Blutkörperchen, sind bei niedrigen Geschwindigkeiten zufällig orientiert, bei hohen Geschwindigkeiten orientieren sie sich um das Fließen zu erleichtern. Aus diesem

## EP 0 976 414 A2

Hagen-Poiseuille ist streng genommen nicht mehr gültig. Trotzdem ist es eine gute Näherung, die Gesetzmäßigkeiten des Blutflusses qualitativ verstehen hilft.

Wenn die Strömungsgeschwindigkeit einer Flüssigkeit eine gewisse Grenze überschreitet, dann geht die laminare Strömung in eine turbulente Strömung über. Diese kritische Geschwindigkeit hängt von der Dichte und der Viskosität der Flüssigkeit sowie vom „Radius“ der Röhre/Kanals ab.

### f) Viskositätswiderstand = Reibungswiderstand

Beim Sinken eines Körpers in einer Flüssigkeit müssen mehrere Kräfte berücksichtigt werden. Es wirken zum einen die Gravitationskraft  $F_{\text{Gra}}$  und der entgegengerichtete Auftrieb  $F_{\text{Auf}}$ . Für die wirksame Differenz beider Kräfte gilt:

$$F_{\text{Gra}} - F_{\text{Auf}} = \frac{4}{3} \cdot \pi \cdot r^3 \cdot (\sigma - \sigma_{\text{fl}}) \cdot g$$

Die Masse  $m$  der Kugel bzw. des kugeligen Elementes und die Masse  $m_{\text{fl}}$  der verdrängten Flüssigkeitsmenge werden durch das Volumen und die zugehörigen Dichten  $\sigma$  und  $\sigma_{\text{fl}}$  ausgedrückt. Wenn nur diese resultierende Kraft wirken würde, ergebe sich eine nach unten beschleunigte Bewegung der Kugel. Dies geschieht auch. Es stellt sich aber schließlich eine gleichförmige Sinkgeschwindigkeit ein. Sie kommt aufgrund der zusätzlich wirkenden Reibungskraft in der Flüssigkeit zustande. Nach Stokes gilt für die Kraft, mit der ein kugelförmiges Teilchen des Halbdurchmessers  $r$  mit konstanter Geschwindigkeit  $v$  durch ein Medium der Zähigkeit  $\eta$  bewegt wird:

$$F_s = 6 \pi \eta r v_z$$

Sie ist geschwindigkeitsabhängig und nimmt mit der Geschwindigkeit zu. Auf diese Weise ist es erklärlich, warum die Sinkgeschwindigkeit einer Kugel zunächst zunimmt, bis bei einer Grenzgeschwindigkeit die bremsende Reibungskraft, die aus Gravitation und Auftrieb resultierende Kraft kompensiert. Der Quotient aus der Kraft  $F_s$  und der Geschwindigkeit  $v_z$  ist der Reibungskoeffizient  $f_R$ , er wird ausgedrückt durch:

$$f_R = 6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r$$

Wenn die Gestalt des/der Teilchen von der Kugelgestalt abweicht, dann darf diese Formel nicht mehr angewendet werden. Es ist zulässig,  $f_R$  zu eliminieren, wenn irgendeine andere Eigenschaft bekannt ist, die von  $f_R$  abhängt. Für den Diffusionskoeffizienten  $D$  der Teilchen in einer verdünnten Lösung gilt:

$$D_K = k T / 6 \pi \eta r$$

Dabei ist es nicht unerheblich welche dynamische Viskosität das strömende Medium besitzt.

### g) Druck [p] und Kompression

$F_n$  ist der Betrag, der senkrecht zur Fläche  $A$  wirkenden Kraftkomponente  $F_n \Rightarrow$

$$p = F_n / A \text{ (N/m}^2\text{)} = 1 \text{ Pascal} = 1 \text{ Pa}$$

Zur Betrachtung der Druckverhältnisse (hydrostatischen Druck) in einer Flüssigkeit muß das Gewicht der Flüssigkeit/Mediums mit einbezogen werden, der Schweredruck muß hinzugefügt werden. Aufgrund der Gewichtskraft  $F_n = m \cdot g$  in einer Flüssigkeitssäule wirkt sich am Boden (Schicht) der Schweredruck aus. Das Volumen einer Flüssigkeitssäule  $V = A \cdot h$ , mit der Dichte  $\sigma$  ist die Masse dieser Säule  $m = \sigma \cdot A \cdot h \Rightarrow$  der Schweredruck am Boden der Flüssigkeitssäule

$$p_s = \sigma \cdot g \cdot h \Rightarrow$$

Der erzeugte Schweredruck ist bei einer bestimmten Substanz mit der Dichte  $\sigma$  nur der Höhe  $h$  der Flüssigkeitssäule proportional. Dies bedeutet, daß in einer beliebigen Tiefe  $h_1$  innerhalb der Flüssigkeitssäule der Schweredruck  $p_1 = \sigma \cdot g \cdot h_1$  beträgt. Bei einer nach oben geöffneten Flüssigkeitssäule wirkt zusätzlich der

## EP 0 976 414 A2

Ganz allgemein gilt, daß sich der Druck in einer bestimmten Höhe unterhalb Flüssigkeitsoberfläche aus Stempeldruck  $p_{st}$  und Schwerdruck zusammensetzt  $\Rightarrow$

$$p = p_{st} + \sigma \cdot g \cdot h$$

Die Zentrifugalkraft  $F_z$  auf ein Masselement  $m$  im Abstand  $r$  von der Drehachse (Umlauffrequenz  $f_{U/sec}$ , Winkelgeschwindigkeit  $\omega = 2 \pi f$ ) ist nach dem II. Newtonschen Axiom definiert

$$F_z = m \cdot r \cdot (2 \pi f)^2$$

Die Zentripetalkraft  $F_p$  ist der von  $F_z$  gleich. Diese kann aber nur durch den Flüssigkeitsdruck  $p$  aufgebracht werden, der danach an der Vorder- und Rückseite  $A$  (gesamtumgebend), bei  $r$  und  $r + \delta r$  des Masselementes sich gerade so unterscheidet, daß die Kraftdifferenz gleich  $F_z$  ist

$$F_p = \sigma_{fl} \cdot A \cdot \delta r \cdot r \cdot \omega \Rightarrow$$

In einer Zentrifuge wird folglich die Schwerebeschleunigung durch die Zentrifugalbeschleunigung  $a_z = r \cdot \omega^2$  ersetzt, und diese ist folglich nur noch vom Abstand  $r$  der Drehachse abhängig. Sie steigt proportional zu diesem Abstand an. Es ist nun möglich die Funktion  $p = p_r$  durch eine einfache Integration aus der Druckgleichung darzustellen,

$$p = p_0 + \sigma_{fl} \cdot \frac{1}{2} \cdot \omega^2 (r^2 - r_0^2)$$

dabei ist  $r_0$  der innere Radius, bei dem der Druck  $p = p_0$  beträgt. Bei den weiteren Überlegungen muß nun berücksichtigt werden ob die entsprechende Flüssigkeit kompressibel ist. Blut als Gemisch ist ein inkompressibles Medium. Die einzelnen Komponenten wiederum besitzen ein unterschiedliches elastisches Verhalten, das Elastizitätsmodul, und sind damit komprimierbar. Ob sich die Komprimierbarkeit auf das Volumen der einzelnen Komponenten auswirkt, hängt von der Größe des Kompressionsmoduls ab.

Die auf einen Querschnitt bezogene, senkrecht zur Oberfläche eines Körpers angreifende Kraft  $\sigma = F/A$  [Einheit =  $1N/m^2 = 1 \text{ Pascal (Pa)}$ ] heißt Normalspannung. Positive Spannungen werden als Zugspannungen, negative als Druckspannungen definiert. Nach dem Hookeschen Gesetz  $\delta l = \alpha \cdot F l_0 / A$  ( $\alpha$  Materialkonstante) ist  $\alpha$  der Dehnungskoeffizient, sein Kehrwert

$$1/\alpha = E$$

ist das Elastizitätsmodul. Dieses hat die gleiche Einheit wie die Spannung  $\sigma$ . Wird auf einen Körper ein allseitiger hydrostatischer Druck  $-\sigma = \delta p$  ausgeübt, so ist die Volumenänderung dreimal so groß:

$$\delta V/V_0 = [3 (1 - 2\mu)/E] \delta p = -\chi \delta p$$

dabei gilt

$$\chi = - (1/V_0) (\delta V/\delta p) = [3 (1 - 2\mu)/E] = 1/K$$

Der reziproke Wert  $1/\chi = K$  heißt Kompressionsmodul. Dieser ist ein Maß für die Volumenelastizität fester und flüssiger Stoffe. Da das Volumen aller Körper durch Druck verkleinert wird ( $\delta V > 0$  für  $\delta p > 0$ ), gilt stets

$$\chi > 0 \text{ und daher } \mu < 1/2$$

Die Kompressibilität von Flüssigkeiten ist temperaturabhängig und übersteigt die von Festkörpern um ein bis zwei Zehnerpotenzen. So ist die von Wasser bei 293 Kelvin  $4,591 \cdot 10^{-10} \text{ Pa}^{-1} = 4,591 \cdot 10^{-5} \text{ bar}^{-1}$ .  $\Rightarrow$

## EP 0 976 414 A2

$$V_{\text{neu}} = V_0 - (\chi \delta p V_0)$$

Wenn auf alle Flächen eines Elementes derselbe spezifische Druck ausgeübt wird, dann wird eine gleichförmige Kompression erzielt. Das Kompressionsmodul  $K$  ist das Verhältnis von Kompressionskraft pro Flächeneinheit / Volumenänderung pro Volumeneinheit. Da alle Materialien ihr Volumen verkleinern, wenn sie einem äußeren Druck ausgesetzt sind, wird ein Minuszeichen eingeführt um  $K$  positiv zu erhalten. Der von der Flüssigkeit ausgeübte Druck ist äquivalent zu seiner Schubspannung, und die relative Volumenabnahme ( $-\delta V/V$ ) ist die Kompressionsverformung. Das Konzept von Kompressionsmodul und Kompressibilität kann sowohl auf Flüssigkeiten und Gase als auch auf Festkörper angewendet werden. Flüssigkeiten und Festkörper sind relativ inkompressibel; sie haben folglich kleine Werte für die Kompressibilität und große für das Kompressionsmodul. Nach dem Gesetz von Boyle und Mariotte (bei konstanter Temperatur) kann wie folgt als Näherung (Einstein Ann. Physik 1905) die Zustandsgleichung für ideale Gase angewendet werden.

$$p V = K n R T \Rightarrow$$

$$K = p V / n R T$$

[  $p$  = Druck ;  $V$  = Volumen;  $n$  = Anzahl Mol;  $R$  = Boltzmann-Konstante;  $T$  = Temperatur (Kelvin) ]

Um ein entsprechendes  $\chi$  für die einzelnen Komponenten zumindest näherungsweise zu erhalten, wird davon ausgegangen, daß die Volumenbestimmungen der Zellkomponenten bei normaler Raumtemperatur (293 Kelvin) und entsprechendem normalen Atmosphärendruck ermittelt werden. Da biologische Elemente zu weit über 90% aus Wasser bestehen, wurde das  $\chi$  für Wasser mitberücksichtigt. Die Zellmembranverdichtung sowie Zellkernverdichtung bei entsprechenden Drücken wurde nicht berücksichtigt.

### h) Stromstärke

Stromstärke (Volumenstrom)

Bei einer inkompressiblen Flüssigkeit wie Blut ist der Volumenstrom durch jede Ebene der Flüssigkeit gleich groß:

$$V_{\text{st}} = v \cdot A = \text{konstant} = \text{cm}^3 / \text{min}$$

### i) Sedimentation

Läßt man einen Körper der Masse  $m$  (z.B. eine Kugel) in einer viskösen Flüssigkeit frei fallen, dann nimmt er nach einer gewissen Anlaufbewegung eine konstante Fallbeschleunigung an, die *Sedimentationsgeschwindigkeit* genannt wird. Sie ist durch das Gleichgewicht bestimmt, das zwischen den folgenden Kräften besteht: Die Gewichtskraft  $F_G = mg$ , die vertikal nach unten gerichtet ist, die Auftriebskraft  $F_A = m_{\text{fl}} g$  ( $m_{\text{fl}}$  Masse des verdrängten Flüssigkeitsvolumens) die vertikal nach oben gerichtet ist und die Reibungskraft  $F_R$  die der Geschwindigkeit des Körpers entgegengerichtet ist. An dem sinkenden Körper haftet eine dünne Flüssigkeitsschicht, und daher ist für die Reibung tatsächlich die innere Reibung der Flüssigkeit bestimmend, nicht die Reibung zwischen fallendem Körper und Flüssigkeit. Für die Reibungskraft als Funktion der Geschwindigkeit gilt, daß sie proportional und entgegengesetzt zur Geschwindigkeit gerichtet ist (negatives Vorzeichen). Daraus folgt

$$F_K = - f_R \vec{v}$$

Speziell, wenn der Körper eine Kugel vom Radius  $r$  ist, gilt die Stokes'sche Formel

$$F_K = - 6 \pi r \eta \vec{v} \quad f_R = 6 \pi r \eta$$

wobei  $\eta$  die dynamische Viskosität (Plasma =  $1,73 \cdot 10^{-3} \text{ Ns m}^{-2}$ ) beträgt.

Konstante Sinkgeschwindigkeit  $v_s$  tritt dann ein, wenn die Summe der Kräfte gleich Null ist. Aus dieser Tatsache läßt sich die Sedimentationsgeschwindigkeit berechnen:

$$m - m_{\text{fl}} = \frac{1 - \sigma_{\text{fl}} / \sigma}{2} \cdot \frac{1 - \sigma_{\text{fl}} / \sigma}{2} \cdot \frac{1 - \sigma_{\text{fl}} / \sigma}{2}$$

## EP 0 976 414 A2

Da die Sedimentationsgeschwindigkeit von der Schwerefeldstärke abhängig ist (proportional), und diese wiederum von Erdoberflächenbeschleunigung  $g$  ( $= 9,81 \text{ m/s}^2$ ) ist es möglich Sinkgeschwindigkeiten von Körpern zu ermitteln. In Zentrifugen ist  $g$  durch die Zentrifugalbeschleunigung  $a_z$  zu ersetzen. Die Sedimentationsgeschwindigkeit kann damit variiert werden. Wenn man das in einer Zentrifuge auftretende Kraftfeld betrachtet, dann wird  $g$  durch  $\omega^2 r_z$  ersetzt; dabei ist  $\omega$  die Winkelgeschwindigkeit ( $= 2\pi f_{\text{U/sec}}$ )  $r_z$  der Abstand des betrachteten Teilchens von der Rotationsachse  $\Rightarrow$

$$f_R = (dr_z/dt) = (1 - v_z \cdot \sigma) \cdot m \cdot \omega^2 \cdot r_z$$

Wenn man nun annimmt, daß die Konstante  $f_R$  im Diffusionsgesetz ( $D = k T / 6 \pi \eta r_K$ ) und im Gesetz für die Sedimentation dieselbe ist, dann kann sie eliminiert werden und man erhält:

$$v_s = M \cdot D_K \cdot (1 - v_z \cdot \sigma) / RT$$

Da bei großen „Molekülen (Zellen)“ weder über die Gestalt noch über das Reibungsgesetz genaue Angaben gemacht werden können, kann man die Möglichkeit, die Masse  $m$  eines Makromoleküls durch seine molare Masse zu ersetzen, nutzen.

$$M_{\text{molar}} = m \cdot N_A = g/\text{mol}$$

Für den Reibungskoeffizienten  $f_R$  zieht man den Zusammenhang mit dem Diffusionskoeffizienten  $D_K$  heran.  
 $D_K = k \cdot T / f_R$ , diese

Beziehung wurde 1905 durch Einstein abgeleitet  $\Rightarrow$

$$N_A \cdot k \cdot T = RT$$

$$v_s = M_{\text{molar}} \cdot D_K \cdot (1 - \sigma \cdot v_z) / RT \cdot r \cdot \omega^2$$

Für die Sedimentationsgeschwindigkeit nach Svenberg gilt:

$$s = (\delta r / (\delta t)) / \omega^2 r = \text{Sedimentationskonstante} \Rightarrow$$

$$v_s = c \cdot r \cdot \omega^2 \cdot M_{\text{molar}} \cdot (1 - v_{sp} \cdot \sigma) (1/f_R)$$

# EP 0 976 414 A2

Um das Sedimentationsgleichgewicht für die einzelnen Komponenten zu bestimmen, im Gleichgewicht sind die Sedimentationsgeschwindigkeiten ausgeglichen kann durch Integration z.B. Abstand 1 gleich  $r_1$  und Abstand 2 gleich  $r_2$ , das molare Massenmittel  $M$  bestimmt werden.

$$M = [2 RT \ln(c_2/c_1)] / [(1-v_{sp}\sigma) \omega^2 (r_2^2 - r_1^2)]$$

Tabelle 3a

	$v_{sp}$	$K$	$\chi$	$f_R$
	$\text{cm}^3\text{g}^{-1}$	$\text{Nm}^{-2}$	$\text{Nm}^{-2}$	$\text{Nscm}^{-1}$
Thrombo	0,9615	1,9421E+09	5,14904E-10	4,48E-06
Lympho	0,9470	1,9127E+09	5,22826E-10	1,39E-05
CD34+	0,9443	1,9073E+09	5,24311E-10	1,79E-05
Mono	0,9407	1,9001E+09	5,26291E-10	2,20E-05
PNC	0,9200	1,8581E+09	5,38174E-10	1,71E-05
Ery	0,9132	1,8446E+09	5,42135E-10	1,22E-05

Tabelle 3b

	$f_R$	$D_K$	$D_K$	$RT$
	$\text{Nsm}^{-1}$	$\text{cm}^2\text{s}^{-1}$	$\text{m}^2\text{s}^{-1}$	$\text{J/mol}$
Thrombo	4,48E-08	9,11E-11	9,11E-14	2,4611E+03
Lympho	1,39E-07	2,95E-11	2,95E-14	2,4611E+03
CD34+	1,79E-07	2,28E-11	2,28E-14	2,4611E+03
Mono	2,20E-07	1,86E-11	1,86E-14	2,4611E+03
PNC	1,71E-07	2,39E-11	2,39E-14	2,4611E+03
Ery	1,22E-07	3,34E-11	2,34E-14	2,4611E+03

[0003] Damit ist in einem Gemisch aus Stoffen unterschiedlicher molarer Massen die Sedimentationsgeschwindigkeit verschieden. Es wird folglich eine Entmischung des Gemisches eintreten, die sich als Dichteänderung der Flüssigkeit bemerkbar macht.

Tabelle 4a

	V lumen	r	d	Dichte
	Liter	m	m	$\text{kg/dcm}^3$
Vollblut				1,060
Plasma				1,030
Thrombo	1,20E-14	1,38E-06	2,75E-06	1,040
Lympho	7,20E-14	2,43E-05	4,86E-06	1,056



# EP 0 976 414 A2

Tabelle 4a (fortgesetzt)

	Volumen	r	d	Dichte
	Liter	m	m	kg/dcm <sup>3</sup>
CD34+	1,00E-13	2,83E-05	5,66E-05	1,059
Mono	1,33E-13	3,14E-05	6,29E-05	1,063
PNC	2,40E-13	3,86E-05	7,71E-05	1,087
Ery	9,20E-14	2,80E-06	5,60E-06	1,095

Tabelle 4b

	Dichte	Dichte	Masse	M <sub>molar</sub>
	g/ml	g/fl	kg/Zelle	kg/mol
Vollblut	1,060	1,060E-15		
Plasma	1,030	1,030E-15		
Thrombo	1,040	1,040E-15	1,25E-14	7,52E+07
Lympho	1,056	1,056E-15	7,60E-14	4,58E+08
CD34+	1,059	1,059E-15	1,06E-13	6,38E+08
Mono	1,063	1,063E-15	1,42E-13	8,53E+08
PNC	1,087	1,087E-15	2,72E-13	1,64E+09
Ery	1,095	1,095E-15	1,01E-13	6,07E+08

[0004] Grundsätzlich erhält man aber keine völlig scharfe Trennung der Komponenten, sondern für jede Komponente kommt es zu einer Verteilung der Anzahldichte, die stets ihr Maximum beim größtmöglichen Abstand von der Drehachse hat. Von diesem Maximum klingt die Dichte nach innen ab und verläuft nach der gleichen Gesetzmäßigkeit wie die Dichte der atmosphärischen Luft.

$$P = p_0 \exp [ - (M_{\text{molar}} \cdot g / RT) \cdot h ]$$

[0005] Ersetzt man nun die in der o.g. Formel  $g$  durch  $a_z$  so erhält man die Anzahldichte der Komponente mit der molaren Masse  $M_{\text{molar}}$

$$n_r = n_0 \exp ( [M_{\text{molar}} / 2 RT] \cdot (1 - \sigma_{\text{fl}} / \sigma) \cdot (r_{\text{max}}^2 - r^2) \cdot \omega^2 )$$

Optimierung der maschinellen Funktionsparametereinstellung von Apheresemaschinen

[0006]

1. Zentrifugenumdrehungsgeschwindigkeit (rpm)  
(Anhang Seite 41; Graphik 1 und 2)

Um eine optimale Sammlung von spezifischen Zellkomponenten zu erhalten, wurden die o.g. physikalischen und biophysikalischen Erkenntnisse herangezogen. Dabei ist es notwendig die Anzahldichte/ $\mu\text{l}$  bzw. /ml innerhalb der Zentrifugen so zu berücksichtigen, daß ein optimales Verhältnis der zu sammelnden Zellkomponenten zu den nicht zu sammelnden Zellkomponenten vorliegt, hierbei müssen insbesondere die Sedimentationsgeschwindigkeiten der einzelnen Komponenten, sowie die Zeit, der sie der Zentrifugalkraft ausgesetzt sind berücksichtigt werden. Allgemein kann für die Zentrifugalwirkung formuliert werden,

$$G = r \cdot [U_{\text{min}}^{-1}/1000]^2 \cdot 11,18 \text{ m s}^{-2} \Rightarrow$$

$$a_r = r \cdot \omega^2 = r \cdot (2 \pi f)^2 \Rightarrow$$

$$a_z = m \cdot r \cdot \omega^2 = m \cdot r \cdot (2 \pi f)^2$$

Für die Zentrifugalwirkung einer Zentrifuge, Abstand von der Zentrifugenachse konstant, stehen die g-Zahl und Zentrifugationsdauer in reziprokem Verhältnis, sodaß bei Verdopplung der Zentrifugendauer die g-Zahl halbiert werden kann und umgekehrt. Der Faktor  $11,18 \text{ m s}^{-2}$  leitet sich von der Erdbeschleunigung ab. Um diese Optimierung zu erreichen, müssen die o.g. Kräfte, Geschwindigkeiten welche innerhalb der Zentrifuge herrschen, möglichst genau bestimmt werden, woraus sich der Trennungsoptimierungskoeffizient =  $T_{\text{OK}}$  oder auch Separationsfaktor SF für die jeweiligen zu sammelnden Zellkomponenten ermitteln läßt.

$$T_{\text{OK}} = [r \cdot (2 \pi f)^2 \cdot t \cdot F_{v_K} \cdot 1/t] / [GF/g]$$

1.1. Die Sammlung von Blutstammzellen bzw. mononukleären Zellen = MNZ ist dadurch gekennzeichnet, daß deren Intervall für  $T_{\text{OK(MNZ)}} = \text{SF}$  zwischen [140 — 190] liegt, genau berechnet bei

$$T_{\text{OK(MNZ)}} = \text{SF} = 176$$

Gegenwärtig werden für die Sammlung dieser Zellkomponenten Mindest-werte gleich  $T_{\text{OK(MNZ)}} = \text{SF}$  von [400 — 500] 500 empfohlen.

1.2. Die Sammlung von Thrombozyten, bei Blutflußgeschwindigkeiten zwischen 30 und 100 ml/min, ist dadurch gekennzeichnet, daß das Intervall für  $T_{\text{OK(MNZ)}} = \text{SF}$  zwischen [600 — 700] liegt, genau berechnet bei

$$T_{\text{OK}(\tau_k)} = \text{SF} = 649$$

Gegenwärtig werden für die Sammlung dieser Zellkomponente Mindest-werte gleich  $T_{\text{OK(MNZ)}} = \text{SF}$  von [1000 — 3700] verwendet.

Da der  $T_{\text{OK}} = \text{SF}$  eine Konstante ist, ist die Umdrehungsfrequenz (rpm) der Zentrifuge vom Gesamteinlaß ( $GF_{\text{ml/min}}$ ), Volumen input (ml/min) in die jeweilige Zentrifugenkammer abhängig und durch die Formel 1 gekennzeichnet  $\Rightarrow$

Formel 1

$$\text{rpm} = a \cdot GF_{\text{ml/min}}^{b1}$$

(a und  $b_1$  sind Konstanten, reelle numerische Werte, die bei der Gewinnung der definierten Zellkomponenten verschieden sind)

**2. Thrombozytenreicher Plasmavolumenanteil ml/min (TrPVat<sub>ml/min</sub>)**

(Anhang Seite 42; Graphik 3)

Für die Ermittlung der optimalen Stelle, an der sich die gewünschten zu sammelnden Zellkomponenten in einem geschlossenen Zentrifugenkanal befinden, kommen die Gesetzmäßigkeiten der Sedimentation zur Anwendung. Es werden sich die Zellkomponenten mit der größten Dichte (spez. Gewicht = kg/dcm<sup>3</sup>) am maximalen, während die mit der geringsten Dichte am minimalsten Abstand von der Drehachse anreichern. Um die o.g. Stelle in dem getrennten Gemisch zu ermitteln, muß beachtet werden, daß Eine, wenn auch nicht völlig scharfe Trennung der einzelnen Komponenten des Gemisches, aber doch eine weitgehende Entmischung eingetreten ist und sich somit eine Dichteänderung des „Gemisches“ eingestellt hat. Um die determinierte Zellkomponente aus dem neu entstandenen „Gemisch“ sammeln zu können, muß der Volumenanteil TrPVat<sub>ml/min</sub> (z.B. thrombozytenreicher Plasmaanteil) des „Gemisches“, welcher sich über der determinierten Zellkomponente gebildet hat entfernt werden. Dieser Vorgang kann z.B. durch eine kontinuierliche Pumpe durchgeführt werden. Zur Gewinnung von thrombozytenreichen Plasma ist dies nicht notwendig, da das thrombozytenreiche Plasma aufgrund der geringsten Dichte die oberste Schicht in dem neu entstandenen „Gemisch“ bildet. Die Ermittlung der Pumpengeschwindigkeit des TrPVat<sub>ml/min</sub> wird durch folgende Formel gekennzeichnet:

**Formel 2**

$$\text{TrPVat}_{\text{ml/min}} = a_{\text{TrPVat}} \cdot e^{-b \cdot \text{Korr.-Hkt.}}$$

Hkt. = Hämatokrit des Vollblutes = der Volumen - Prozentanteil, den in 1 µl Vollblut die Erythrozyten einnehmen.

Hkt. (%) \* 10 = MCV (µm<sup>3</sup>) \* Ery 10<sup>6</sup>/µl

Näherungswerte des Volumenanteiles (%) der einzelnen spezifischen Zellkomponenten (Zk spez.) in 1 µl Vollblut =

1. Für Thrombozyten (%) \* 10<sup>6</sup> = Anzahldichte/µl (Azd<sub>µl</sub>) \* Zellvolumen fl (ZV<sub>fl</sub>) z.B. Azd<sub>µl</sub> = 166 \* 10<sup>3</sup>; ZV<sub>fl</sub> = 1,2 \* 10<sup>-14</sup> dcm<sup>3</sup> ⇒ 0,199 %

2. Für die Leukozyten, muß durch die Differentialblutbestimmung bzw. mittels Durchflußzytometrie die relativen Prozentanteile innerhalb der Leukozyten ermittelt werden: z.B. (Leukozyten =) Azd<sub>µl</sub> = 35.6 \* 10<sup>3</sup> ⇒

2.1. Für Lymphozyten (5%) Azd<sub>µl</sub> = 1.78 \* 10<sup>3</sup>; ZV<sub>fl</sub> = 7,2 \* 10<sup>-14</sup> dcm<sup>3</sup> ⇒ 0.013 %

2.2. Für CD34+ (1%) Azd<sub>µl</sub> = 3,56 \* 10<sup>2</sup>; ZV<sub>fl</sub> = 10 \* 10<sup>-14</sup> dcm<sup>3</sup> ⇒ 0.004 %

2.3. Für Monozyten (8%) Azd<sub>µl</sub> = 2,85 \* 10<sup>3</sup>; ZV<sub>fl</sub> = 13 \* 10<sup>-14</sup> dcm<sup>3</sup> ⇒ 0.038 %

2.3. Für PNC (86%) Azd<sub>µl</sub> = 30,6 \* 10<sup>3</sup>; ZV<sub>fl</sub> = 25 \* 10<sup>-14</sup> dcm<sup>3</sup> ⇒ 0.765 %

3. Für Erythrozyten Azd<sub>µl</sub> = 4,79 \* 10<sup>6</sup>; ZV<sub>fl</sub> = 9,4 \* 10<sup>-14</sup> dcm<sup>3</sup> ⇒ 45,02 %

Daraus ergibt sich ein „zellfreier“ Plasmaanteil von 54%.

Aus den oben gezeigten Daten wird ersichtlich, daß der Hämatokrit, gemessen am Gesamtzellvolumenanteil etwa 1 % höher liegt ⇒ 46%.

Die nachfolgenden Tabelle 5a und 5b kennzeichnen durch die Anzahldichteformel wie sich die Anzahldichte der Zellkomponenten auf der Grundlage von

$$n_r = n_0 \exp \left( [M_{\text{molar}} / 2 RT] \cdot (1 - \sigma_{fl} / \sigma) \cdot (r_{\text{max}}^2 - r^2) \cdot \omega^2 \right)$$

unter definierter Krafteinwirkung verändert.

Als Ausgangspunkt wurden die Daten des Beispiels der Beschreibung für TrPVat und der Umdrehungsgeschwindigkeiten (Graphik 1) eingesetzt.

Tabelle 5a

GF	Thrombo	Lympho	CD34+
30	2,92E+06	3,62E+04	7,40E+03
40	2,97E+06	3,68E+04	7,51E+03
50	3,01E+06	3,72E+04	7,59E+03

# EP 0 976 414 A2

Tabelle 5a (fortgesetzt)

GF	Thrombo	Lympho	CD34+
60	3,04E+06	3,75E+04	7,65E+03
70	3,07E+06	3,78E+04	7,71E+03
80	3,09E+06	3,80E+04	7,75E+03
90	3,11E+06	3,82E+04	7,80E+03
100	3,12E+06	3,84E+04	7,83E+03
110	3,14E+06	3,86E+04	7,87E+03
120	3,15E+06	3,87E+04	7,90E+03
130	3,17E+06	3,89E+04	7,93E+03
140	3,18E+06	3,90E+04	7,95E+03
150	3,19E+06	3,91E+04	7,98E+03

Tabelle 5b

GF	Mono	PNC	Ery
30	6,04E+04	6,86E+05	1,03E+08
40	6,12E+04	6,94E+05	1,04E+08
50	6,19E+04	7,01E+05	1,06E+08
60	6,24E+04	7,07E+05	1,06E+08
70	6,28E+04	7,12E+05	1,07E+08
80	6,32E+04	7,16E+05	1,08E+08
90	6,36E+04	7,19E+05	1,08E+08
100	6,39E+04	7,22E+05	1,09E+08
110	6,41E+04	7,25E+05	1,09E+08
120	6,44E+04	7,28E+05	1,10E+08
130	6,46E+04	7,30E+05	1,10E+08
140	6,48E+04	7,33E+05	1,10E+08
150	6,50E+04	7,35E+05	1,11E+08

[0007] Aus den oben gezeigten Anzahldichteveränderungen ist ersichtlich, daß die zellulären Komponenten, auch wenn sie keinen großen prozentualen Volumenanteil annehmen, im Gesamt — Komplex beachtet werden müssen, da die jeweils determinierte Zellkomponente nach der Entfernung des Plasmas ihren Volumendichte-Anteil verändert. Aufgrund dieser Gegebenheit wurde für die Ermittlung von  $TrPVat_{m/min}$  der Hämatokrit-Korrekturfaktor eingeführt.

[0008] In den nachfolgenden Tabelle 6 sind zur Vereinfachung der prozentuale Korrekturfaktor für den Hämatokrit in Abhängigkeit vom PNC-Anteil = Korr.-Hkt. dargestellt.

Tabelle 6

Leukozytenwerte	PNC — Anteil	PNC — Anteil	Abweichung	Abweichung	Hämatokrit für TrP-
-----------------	--------------	--------------	------------	------------	---------------------

# EP 0 976 414 A2

Tabelle 6 (fortgesetzt)

Leukozytenwerte pro/Mikroliter Range	PNC — Anteil	PNC — Anteil	Abweichung Hämatokrit (Labor)	Abweichung Hämatokrit n. Berechnung	Hämatokrit für TrP- Vat
	PNC < 2500		3%	-0,75%	[(Hkt*103)*99,25]
		2500 > PNC	-3%	5%	[(Hkt*97)*105]
5000 — 10000					
	PNC < 6000		3%	-5,50%	[(Hkt*103)*94,5]
		PNC < 9000	-3%	7,5%	[(Hkt*97)*107,5]
10000 — 15000					
	PNC<10000		3%	-5,5%	[(Hkt*103)*94,5]
		PNC < 13000	-3%	7,5%	[(Hkt*97)*107,5]
15000 — 20000					
	PNC<15000		3%	-5,5%	[(Hkt*103)*94,5]
		PNC < 19000	-3%	7,5%	[(Hkt*97)*107,5]
20000 — 25000					
	PNC<19000		3%	-5,50%	[(Hkt*103)*94,5]
		PNC < 21000	-3%	7,5%	[(Hkt*97)*107,5]
25000 — 30000					
	PNC<24000		3%	-5,50%	[(Hkt*103)*94,5]
		PNC < 26000	-3%	7,5%	[(Hkt*97)*107,5]
30000 — 35000					
	PNC<27000		3%	-5,5%	[(Hkt*103)*94,5]
		PNC<29000	-3%	7,5%	[(Hkt*97)*107,5]
35000 — 40000					
	PNC<33000		3%	-5,50%	[(Hkt*103)*94,5]
		PNC<37000	-3%	7,5%	[(Hkt*97)*107,5]
40000 — 45000					
	PNC<38000		3%	-5,50%	[(Hkt*103)*94,5]
		PNC<42000	-3%	7,5%	[(Hkt*97)*107,5]
45000 — 55000					
	PNC<40000		3%	-5,50%	[(Hkt*103)*94,5]
		PNC>43000	-3%	7,5%	[(Hkt*97)*107,5]

[0009] Zur Berechnung des Exponentenfaktors „b“ von  $TrPVat_{ml/min}$  ist  $GF_{ml/min}$  nötig.

$$b_{TrPVat} = m_1 : e^{b_1 \cdot GF (ml/min)}$$

( $m_1$  und  $b_1$  sind konstante Faktoren, die bei der Gewinnung der definierten Zellkomponenten verschieden sind)

[0010] Zur Berechnung der Konstanten „a“ von  $TrPVat_{ml/min}$  ist  $GF_{ml/min}$  nötig.

$$a_{TrPVat} = m_2 : e^{-b_2 \cdot GF (ml/min)}$$

( $m_2$  und  $b_2$  sind konstante Faktoren, die bei der Gewinnung der definierten Zellkomponenten verschieden sind)

**3. Sammelvolumenflußberechnung =  $S_{VF}$  (ml/min)**

(Anhang Seite 43 ; Graphik 4)

Zur Berechnung des Sammelflusses  $S_{VF}$  der verschiedenen Zellkomponenten wurde die Volumenstromgeschwindigkeit, die Zellkomponenten-volumenänderung, die veränderte Anzahldicke und  $TrPVat_{ml/min}$ , welche durch die Zentrifugalkraft bedingt ist, berücksichtigt.  $S_{VF}$  wird durch die Formel 3 gekennzeichnet

**Formel 3**

$$S_{VF} \text{ (ml/min)} = [(\ln(\text{Korr.Hkt.}) \cdot A_1) - (A_2 \cdot e^{-b_3 \cdot \text{Korr.Hkt.}})] \cdot F$$

$$A_1 = m_1 \cdot e^{(b_{SVF1}) \cdot x} \\ (x = GF_{ml/min})$$

( $m_1$  und  $b_{SVF1}$  sind konstante Faktoren, die bei der Gewinnung der definierten Zellkomponenten verschieden sind)

$$A_2 = m_2 \cdot e^{(b_{SVF2}) \cdot x} \\ (x = GF_{ml/min})$$

( $m_2$  und  $b_{SVF2}$  sind konstante Faktoren, die bei der Gewinnung der definierten Zellkomponenten verschieden sind)

$$b_3 = m_3 \cdot e^{(b_{SVF3}) \cdot x} \\ (x = GF_{ml/min})$$

( $m_3$  und  $b_{SVF3}$  sind konstante Faktoren, die bei der Gewinnung der definierten Zellkomponenten verschieden sind)

F = Korrekturfaktor

Für Gesamteinlaßflüsse < 123 ml/min bzw. < 51 ml/min beträgt er — 0,2;

für Gesamteinlaßflüsse 123 — 51 ml/min + 0,2

Volumenveränderung von Zellkomponenten bei bestimmten Volumeneinlaßgeschwindigkeiten (ml/min), auf der Grundlage definierter Winkelgeschwindigkeiten (az A1 und az A4) bei konstantem Trennungsoptimierungsfaktor gleich Separationsfaktor.

Tabelle 7a

GF ml/min	p		Thrombo	Lympho	CD 34+
	N/m <sup>2</sup>	bar	dcm <sup>3</sup>	dcm <sup>3</sup>	dcm <sup>3</sup>
	1,01E+05	0,9807	1,2000E-14	7,2000E-14	1,0000E-13
21	1,98E+05	1,9756	1,1999E-14	7,1997E-14	9,9995E-14
31	2,97E+05	2,9659	1,1999E-14	7,1993E-14	9,9990E-14
41	3,95E+05	3,9546	1,1998E-14	7,1990E-14	9,9986E-14
51	4,95E+05	4,9469	1,1998E-14	7,1986E-14	9,9981E-14
62	5,94E+05	5,9367	1,1997E-14	7,1983E-14	9,9976E-14
72	6,94E+05	6,9351	1,1997E-14	7,1979E-14	9,9971E-14

# EP 0 976 414 A2

Tabelle 7a (fortgesetzt)

GF	p		Thrombo	Lympho	CD 34+
	ml/min	N/m <sup>2</sup>	bar	dcm <sup>3</sup>	dcm <sup>3</sup>
82	7,92E+05	7,9239	1,1996E-14	7,1976E-14	9,9966E-14
92	8,91E+05	8,9093	1,1995E-14	7,1972E-14	9,9961E-14
103	9,90E+05	9,9038	1,1995E-14	7,1969E-14	9,9957E-14
113	1,09E+06	10,8998	1,1994E-14	7,1965E-14	9,9952E-14
123	1,19E+06	11,8902	1,1994E-14	7,1962E-14	9,9947E-14
133	1,29E+06	12,8682	1,1993E-14	7,1959E-14	9,9942E-14
144	1,39E+06	13,8561	1,1993E-14	7,1955E-14	9,9937E-14
154	1,49E+06	14,8507	1,1992E-14	7,1952E-14	9,9933E-14

Tabelle 7a

GF	p		Mono	PNC	Ery
	ml/min	N/m <sup>2</sup>	bar	dcm <sup>3</sup>	dcm <sup>3</sup>
	1,01E+05	0,9807	1,3300E-13	2,4000E-13	9,2000E-14
21	1,98E+05	1,9756	1,3299E-13	2,3999E-13	9,1995E-14
31	2,97E+05	2,9659	1,3299E-13	2,3998E-13	9,1991E-14
41	3,95E+05	3,9546	1,3298E-13	2,3996E-13	9,1986E-14
51	4,95E+05	4,9469	1,3297E-13	2,3995E-13	9,1982E-14
62	5,94E+05	5,9367	1,3297E-13	2,3994E-13	9,1977E-14
72	6,94E+05	6,9351	1,3296E-13	2,3993E-13	9,1972E-14
82	7,92E+05	7,9239	1,3295E-13	2,3992E-13	9,1968E-14
92	8,91E+05	8,9093	1,3295E-13	2,3991E-13	9,1963E-14
103	9,90E+05	9,9038	1,3294E-13	2,3989E-13	9,1959E-14
113	1,09E+06	10,8998	1,3294E-13	2,3988E-13	9,1954E-14
123	1,19E+06	11,8902	1,3293E-13	2,3987E-13	9,1950E-14
133	1,29E+06	12,8682	1,3292E-13	2,3986E-13	9,1945E-14
144	1,39E+06	13,8561	1,3292E-13	2,3985E-13	9,1940E-14
154	1,49E+06	14,8507	1,3291E-13	2,3983E-13	9,1936E-14

## Formel 4

$$\text{ACD ml/h} = M = \text{BF} \cdot 2,5 \%$$

$$\Rightarrow \text{BF} : \text{ACD} = 40 : 1$$

Dadurch erhält der Spender deutlich weniger Antikoagulanzen und somit treten weniger Nebenwirkungen auf.

5. ACD - Perfusor- Geschwindigkeit ml/h  
ist gekennzeichnet durch

## Formel 5

$$\text{Perfusorgeschwindigkeit ml/h} = P = S_{VF} \cdot 250 \%$$

Dadurch wird gewährleistet, daß in dem gesammelten statischen Präparat gezielt ausreichend Antikoagulanzen vorhanden ist.

6. ACD - Konzentration (K) im Präparat  
ist gekennzeichnet durch

## Formel 6

$$K : \text{ACD} = (S_{VF} \text{ ml} \cdot 250 \% + S_{VF} \text{ ml} \cdot 2,5 \%)$$

$$\Rightarrow K : \text{ACD} = 15 : 1$$

#### Erläuterung zur Verfahrenstechnik - Verbesserung bei Veränderungen der spez. Proteinkonzentrationen im Blutplasma

[0011] Werden die zellulären Elemente des Blutes durch Zentrifugation abgetrennt, so erhält man eine proteinhaltige Flüssigkeit, das **Blutplasma**. Der gewonnene Überstand des geronnenen Blutes ist das **Blutserum**.

[0012] Blutplasma ist ein komplexes Gemisch aus Glyko- und Lipoproteinen. Der Gesamtproteingehalt des Plasmas beträgt 6 — 8 g/100ml. Die nachfolgende Tabelle zeigt eine Auswahl über die Molekulargewichte bzw. der Konzentrationen im Plasma/Serum, welche den größten Anteil einnehmen.

Tabelle 8

Element	Molekulargewicht	Konzentration	Svedberg	Dichte	d
	$10^{-3}$	g/dcm <sup>3</sup>	$10^{-13}$ s		nm
IgG	143-149	9-15	7 S		
IgA	158-162	1,4-2,6	7 S		
IgM	800-950	0,7-1,8	19 S		



Tabelle 8 (fortgesetzt)

Element	Molekulargewicht	Konzentration	Svedberg	Dichte	d
	$10^{-3}$	g/dcm <sup>3</sup>	$10^{-13}$ s		nm
$\alpha_2$ -Makroglobulin	820	2,6			
Fibrinogen	341	2-3			
Haptoglobin	100	1,7			
$\beta$ -Lipoproteine (LDL)	3200	0,34		1,000 -1,063	15-25
Lipoproteine (VDL)	5000	0,8		0,94 -1,006	30-70
$\alpha$ -Lipoproteine (HDL)	200	3		1,063 -1,210	7-10

**[0013]** Erkrankungen, die eine Erhöhung der Akute-Phase-Proteine verursachen und/oder mit einer monoklonalen/polyklonalen Immunglobulinvermehrung bzw. Immunkomplexvermehrung einhergehen, verändern:

1. die dynamische Viskosität  $\eta$  des Mediums, Plasma/Serums
2. sie können sich je nach Größe des Moleküls, der Sedimentationsgeschwindigkeit und Konzentrationserhöhung (g/l) zwischen die zu sammelnden Zellkomponenten schieben und damit eine Proteinschicht bilden, welche eine Sammlung von unerwünschten Zellkomponenten z.B. bei der Stammzellsammlung (CD34+) die „Kontamination“ mit polymorphkernigen Zellen deutlich erhöht.

#### 7. Verfahrensverbesserung

Um annähernd normale physiologische Plasmaproteinkonzentrationen zu erhalten, welche zur optimalen Gewinnung spez. Zellkomponenten Voraussetzung sind, müssen die o.g. Proteinkonzentrationserhöhungen eliminiert werden. Dies wird erreicht, indem das Blut des Spenders einem konventionellen Plasmaaustausch (TPE = Therapeutic Plasma Exchange) unterzogen wird. Durch den TPE wird das Plasma von den zellulären Bestandteilen mittels der Zentrifugenapheresemaschine, insbesondere von den Plasmaproteinen getrennt, welche verworfen und kontinuierlich durch eine humane Proteinlösung isovolumetrisch ersetzt werden. Das „gereinigte“ Plasma wird dann mit den zellulären Komponenten gemischt, dem Spender reinfundiert oder dem Zellaphereseverfahren unterzogen und dann dem Spender reinfundiert. Hierzu sind zwei unterschiedliche Verfahrensweisen möglich:

1. Das sequentielle Verfahren
- oder
2. das kombinierte Verfahren

Beide Verfahren sind im Anhang auf Seite 44 durch Fluß - Diagramme gekennzeichnet.

#### 8. Technische Veränderungen bzw. Verfahrenstechniken

Erläuterungen zu Skizze 1 (Anhang Seite 45)

Skizze 1 kennzeichnet die gesamten Veränderungen bzw. Verfahrenstechniken im Überblick. Bevor die entsprechenden Verfahren gestartet werden können, müssen außer den üblichen Hard-Software-Kontrollen, die Aphereseschlauchsysteme entlüftet werden. Dieser Füllvorgang geschieht gegenwärtig durch eine physiologische Kochsalzlösung = B 1 (Na Cl 0,9%). Über einen an B 1 konnektierten Schlauch, welcher an den Entnahmeschlauch (Inlet-Line) zur Maschine führend, angeschweißt ist, wird über die Pumpe P 1 die Lösung in das eingelegte Schlauchsystem infundiert. Am Rückführungsschlauch (Outlet-Line) von der Maschine kommend, ist ein an B 1 konnektierbarer Entlüftungsschlauch angeschweißt. Inlet-Outlet-Line bilden somit einen geschlossenen Kreislauf. Die zu entfernende Luft des Schlauchsystems wird in den Beutel B 4 gepumpt, dadurch wird eine Kontamination der Flüssigkeit mit Luftpartikeln weitgehend ausgeschlossen. Nach Abschluß des Füll- und Spülvorganges wird sowohl Inlet- und Outlet- Line mit einer Rollklemme verschlossen.

Während des Aphereseverfahrens wird das entsprechende Blutgemisch über die Inlet-Line und mittels P 1 zur Maschine geführt. Vor Eintritt in die Zentrifugenkammer/Zentrifuge wird dem „Gemisch“ über P 2 aus B3 in der Mischkammer (= MK1) Kammer in einem definierten Verhältnis das Antikoagulant (ACD) [100 ml ACD enthalten 2,2 g wasserhaltiges Natriumzitrat, 730 mg wasserfreie Zitronensäure und 2,45 g wasserhaltige Glukose] in der Regel im Verhältnis Blutfluß:ACD von 1:10-15, zur Verhinderung der Koagulation des Gemisches zugeführt.

#### 9. Technische Neuerung - Veränderung 1 (Skizze 1 Seite 45)

Die technische Veränderung 1 ist durch das Anschweißen eines an den Behälter B 2 konnektierbaren Schlauch-

ches (Detailskizze Anhang Seite 47 u. 48) über eine „Y-Verbindung“ (inlet-line), durch den zusätzlichen Beutel B 2 und dessen Inhalt gekennzeichnet. In dem Behältnis B 2 befindet sich eine 5%-ige Humanalbumin-Lösung. Mit dieser Lösung wird das Apheresesystem primär gespült, und wie oben beschrieben entlüftet. Nach einer Einwirkzeit von 5 - 10 Minuten des Humanalbumins folgt dem primären Schritt ein weiterer wie oben beschriebener Spülvorgang mit physiologischer Kochsalzlösung (NaCl 0,9%) um den größten Teil der primären Lösung wieder zu entfernen.

Bei der Primärspülung sind die Ventile der inlet-outlet-line (Rasterklemme) unterhalb von B 1 geschlossen, die von B 2 (Rollklemme und Rasterklemme) geöffnet. Bei der Sekundärspülung ist das Ventil der inlet-line unterhalb von B 1 geöffnet, das von B 2 geschlossen. Das outlet-Ventil (Rasterklemme) von B 2 ist während der sekundären Spülung, solange geöffnet wie bei der Primärspülung Volumen verwendet wurde. Das von B 1 ist für das gleiche Zeitintervall geschlossen, volumen-gesteuerte Schließung und Öffnung. Nach Erreichen des Volumens wird ein akustisches Signal ausgelöst, welches den Operator zur Öffnung und Schließung der genannten Ventile auffordert. Damit wird weitgehend das Humanalbumin zurück nach B 2 befördert.

Der Sinn der primären Spülung mit 5%-iger Humanalbumin-Lösung ist es die bekannten Adhärenzkräfte welche Plastikoberflächen auf zelluläre Bestandteile ausüben, wenn diese mit ihnen in Kontakt treten, zu minimieren sowie deren Aggregation weitgehend zu verhindern. Zur Minimierung dieser Interaktionen, sind Humanalbumin-Moleküle sehr gut geeignet, coating von Plastikschauchsystemen. Durch diese Primärspülung/Entlüftung wird der Verlust von zellulären Bestandteilen bei den Zellaphereseverfahren, welche durch „Plastik“-Schlauchsysteme induziert werden, deutlich reduziert.

#### 10. Technische Neuerung - Veränderung 2 (Skizze 1 Seite 45)

Die technische Veränderung 2 ist durch das Anschweißen eines an P 5 konnektierbaren Schlauches, über eine „Y-Schlauchverbindung“, in den Sammelschlauch, der über P 4 zu B 5 führt, gekennzeichnet (Detailskizze Anhang Seite 48 u. 49).

Der direkte Weg aus der Zentrifugenkammer über P 4 nach B 5 ist die Sammellinie für die definierten Zellkomponenten. Unterhalb von der „Y-Verbindung“ von B 5 und P 5 befindet sich ein Ventil, das während des Sammelvorganges geöffnet ist, während das Ventil oberhalb von P 4 geschlossen ist und umgekehrt. Über den von P 5 kommenden Schlauch wird während des Sammelvorganges eine definierte Menge ACD pro Zeiteinheit, welche durch das Sammelvolumen pro Zeiteinheit (ml/min) definiert ist, dem Sammelvolumen direkt zugemischt. Hierdurch wird zum Einen eine gezielte Antikoagulation (volumengerecht z.B.  $K : ACD = 12 - 15 : 1$ ) für das Produkt erreicht und zum Anderen die Menge des Antikoagulanz, welche z. B. ein potentieller Spender über die Linie B3 → P 2 erhält, deutlichst verringert. Dies hat zur Folge, daß die Nebenwirkungen, welche von dem Antikoagulanz (ACD) bekannt sind auf ein Minimum reduziert werden, ohne daß das gewonnene Produkt, welches sich in einem statischen Gleichgewicht befindet, koaguliert.

#### 11. Technische Neuerung - Veränderung 3 (Skizze 1 Seite 45)

Die technische Veränderung 3 ist durch den Einbau einer zusätzlichen Pumpe bzw. eines Perfusors, wie in der Skizze 1 dargestellt, gekennzeichnet. Diese Pumpe wird über ein Relais aktiviert, welches eine Verbindung zum Ventil unterhalb der „Y-Schlauchverbindung“ von B 5 und P 5 besitzt. Bei Öffnung des Ventils wird ein akustisches Signal ausgelöst, dieses fordert den Operator auf die Pumpe P 5 zu aktivieren. Durch das vorher definierte Volumen/Minute, wird über den Schlauch der von P 5 läuft Antikoagulanz, berechnet nach Sammelvolumen welches durch die Pumpe P 4 nach B 5 befördert wird, hinzugemischt. Damit kann eine genaue Antikoagulation Milliliter/Zeiteinheit dem definierten Produkt in B 5 zugeführt werden.

#### 12. Technische Neuerung - Veränderung 4 (Skizze 1 Seite 45)

Die technische Veränderung 4 ist durch das Anschweißen eines an den Behälter B 2 konnektierbaren Schlauches (Detailskizze Anhang Seite 46 u. 47) über eine „Y-Verbindung“ (out-line) gekennzeichnet. Während des Primärspülvorganges ist das outlet-Ventil (Rasterklemme) durchgehend geöffnet. Dieses Ventil wird während des sekundären Spülvorganges nach den Erläuterungen auf Seite 32-33 geschlossen. Über diese zusätzliche Linie wird der notwendige geschlossene Kreislauf während der Primärspülung geschaffen.

#### 13. Technische Verbesserung der Sammelpumpe P4 (Skizze 1 Anhang Seite 45)

Die technische Veränderung der Sammelpumpe P 4 ist dadurch gekennzeichnet, daß diese Pumpe durch einen Riemenantrieb bewegt wird (Detailskizze Anhang Seite 50). Um eine möglichst genaue Sammlung (0,1 ml/min Intervalle) über den Schlauch, welcher aus der Zentrifugenkammer über P 4 nach B 5 (Sammelbeutel) führt, zu erreichen, darf P 4 keine ruckartigen Bewegungen durchführen. Das Getriebe von P 4 muß über sehr kleine Radbewegungen verfügen können um auch extrem kleine Volumen-Zeit-Einheiten, gemessen am Sammel-

## EP 0 976 414 A2

gestattet. Ruckartige oder diskontinuierliche Bewegungen bewirken, daß im Sammelschlauch Sogwirkungen entstehen, welche eine übermäßige Kontamination mit unerwünschten Zellkomponenten in B 5 zur Folge haben und somit die Qualität des Produktes verschlechtern. Ferner treten durch solche Sogwirkungen Veränderungen des  $\text{TrPVat}_{\text{ml/min}}$  ein, welches eine Unterbrechung des Sammelvorganges zur Folge hat. P 4 wird über ein Zahnradgetriebe, welches ein Rad an dem der Riemen, welcher die Verbindung zur Pumpe P 4 herstellt, angetrieben. Damit können ruckartige Bewegungen vermieden und kleinere Volumen pro Zeiteinheit transportiert werden.

14. Im nachfolgenden wird dargelegt, daß für eine spezifische Sammlung entsprechender weißer Blutkörperchen, Lymphozyten, Blutstammzellen und Monozyten, sowohl während der Zellapherese als auch in einer nachgeschalteten Prozedur, spezifische, auf die jeweilige Zellkomponente ausgerichtete Sedimentationsbeschleuniger eingesetzt werden könnten. Diese müßten über die in Tabelle 9a +9b angezeigten Näherungswerte verfügen.

Tabelle 9a

	Dichte	$v_{\text{sp}}$	K	$\chi$
Für	g/ml	$\text{cm}^3\text{g}^{-1}$	$\text{Nm}^{-2}$	$\text{Nm}^{-2}$
Lympho	1,0587	0,94457	1,90784E+09	5,24153E-10
CD34+	1,0626	0,94106	1,90082E+09	5,26088E-10
Mono	1,0846	0,92207	1,8623E+09	5,3697E-10

Tabelle 9b

	$f_R$	$D_K$	RT
Für	$\text{Nscm}^{-1}$	$\text{cm}^2\text{s}^{-1}$	J/mol
Lympho	1,750E-05	2,347E-11	2,4611E+01
CD34+	2,159E-05	1,902E-11	2,4611E+01
Mono	1,759E-05	1,865E-11	2,4611E+01

Die spezifischen Sedimentationsbeschleuniger würden dann als Makromoleküle in Abhängigkeit von der zugeführten Konzentration, zum Einen, die entsprechende Zellkomponenten welche die größere Sedimentationskonstante besitzen in ihrer Sedimentation beschleunigen. Zum Anderen eine Grenzschicht zwischen diesen und der definierten Zellkomponente, welche gesammelt werden soll bilden, und damit die qualitative Sammlung weiter verbessern.

15. In der Tabelle 10 wird dargelegt, welche Ergebnisse z.B. bei der Sammlung von Blutstammzellen erreicht werden, wenn der neu berechnete Trennungsoptimierungskoeffizient =  $T_{OK}$  angewendet wird. Dadurch wird der Thrombozytenverlust des Spenders im Verhältnis zu den bisher verwendeten  $T_{OK}$ 's im Mittel um 70%, die benötigte

Tabelle 10

	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
Blutvolumen	155	3469	6900	4823,89	860,98
Proz.-Volumen	155	3033	39025	24119,92	7073,04
Proz.-Zeit-Min	155	50	282	180,81	39,39
ACD-Verbrauch	155	77	1380	650,55	201,14
Sammel-Volumen	158	50	400	224,35	66,06
Thrombo-VorApherese	150	1,6E+02	6,8E+05	1,5E+05	1,0E+05
Thrombo-Nach-Apherese	126	1,2E+04	5,6E+05	1,4E+05	9,4E+04
Thrombo-Verlust	151	2,2E+04	3,2E+05	3,6E+04	5,9E+04
Thrombo-Verl.-Proz * 100	115	,0100	,1830	,107202	8,45E-02
Leuko-Kons.-Absolut	158	,0000	2,8E+11	2,7E+10	2,7E+10
MNC-Konz.-Absolut	156	,0000	2,1E+11	1,7E+10	1,9E+10
MNC-Konz.-Proz.	139	75	100	91,71	7,94
CD34+/kg	110	0,0E+00	2,7E+07	3,2E+06	4,5E+06
Thrombo-Konz./100 ml	156	,0000	2,4E+11	3,0E+10	3,7E+10
Thrombo-Konz.-Absolut	156	,0000	3,8E+11	6,3E+10	7,2E+10
	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
Hämatokrit	141	,000	,130	5,43E-02	1,89E-02
Ery.-Konz.-Absolut	156	,0000	4,3E+11	1,1E+11	7,6E+10

16. Für die spezifische Sammlung spezifischer weißer Blutkörperchen, namentlich von Lymphozyten, Monozyten und ProgenitorBlutstammstellen werden bekanntermaßen spezifische Aufreinigungsfahren, Purging-Verfahren, eingesetzt. Bei diesen Verfahren stören insbesondere die Monozyten in den Leukapherese-Produkten, da diese insbesondere viele Dynabeads binden und somit für das eigentliche Purging nicht mehr zu Verfügung stehen. Im nachfolgenden wird dargelegt, daß das Apherese-Produkt über einen Schlauch (Einlaßseite) mit einem aus Silikon beschichteten Zylinder oder einen aus Glas bestehenden Zylinder, mit einer Oberfläche von  $> 600 \text{ cm}^2$ , eingefüllt wird. Die jeweiligen Endseiten sind mit dem gleichen Material ausgestattet und verfügen über einen Leuer-Anschluß. Dieser Zylinder befindet sich auf einem um 360 Grad beweglichen Stativ 2 Umdrehung pro Minute, wobei innerhalb des Stativs der Zylinder ebenfalls im 360 Grad mit einer Geschwindigkeit von 4 Umdrehungen pro Minute bewegt wird. Das Apherese-Produkt wird dadurch gut suspendiert, so daß die Monozyten auf der Oberfläche adhären können. Die Inkubationszeit beträgt 30 Minuten. Am Ende der Prozedur wird das Produkt über einen konnektieren Schlauch (Auslaßseite) in einen entsprechenden Beutel überführt und kann dem Purging-Verfahren zugeführt werden.

17. Im nachfolgenden wird dargelegt, daß die unter Punkt 16 an die Zylinder-Oberfläche adhären Monozyten

## Anhang

$n$  = Anzahldichte (z.B. Thrombozyten  $300 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ )

$n_0$  = Anzahldichte bei Start  $\Rightarrow n_0$

$n_r$  = Anzahldichte bei definierten Umdrehungsgeschwindigkeiten der Zentrifuge  $\Rightarrow n_r$

$M$  = Masse des Makromoleküls  $M_{\text{molar}}$

$m = M_{\text{molar}} / N_A \Rightarrow M_{\text{molar}} = m \cdot N_A$

$N_A$  = Avogadro-Zahl  $6,0220921 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$

$k$  = Boltzmann-Konstante  $1,380658 \cdot 10^{-23} \text{ J/K}$  ( $K$  = Kelvin)

$T$  = Absolute Temperatur Kelvin ( $t/^\circ\text{C} + 273$ ) (abs. Nullpunkt =  $-273 \text{ K}$ )

$D$  = Diffusionskoeffizient  $\Rightarrow D = kT/f$

$f_R$  = Reibungskoeffizient  $\Rightarrow f_R = 6 \pi r \eta$

$r_K$  = Radius des Elementes (z.B. Thrombozyten =  $1,38 \cdot 10^{-6} \text{ m}$ )

$\eta$  = dynamische Viskosität des strömenden Mittels

für Plasma  $1,73 \cdot 10^{-3} \text{ Ns m}^{-2}$  (bei  $23^\circ\text{C}$  bzw.  $296 \text{ K}$ )

[von  $23^\circ\text{C}$  bis  $30^\circ\text{C}$   $0,032857142 \cdot 10^{-3} \text{ Ns m}^{-2}/^\circ\text{C}$ ]

für Plasma  $1,50 \cdot 10^{-3} \text{ Ns m}^{-2}$  (bei  $30^\circ\text{C}$  bzw.  $306 \text{ K}$ )

[von  $30^\circ\text{C}$  bis  $37^\circ\text{C}$   $0,028571428 \cdot 10^{-3} \text{ Ns m}^{-2}/^\circ\text{C}$ ]

für Plasma  $1,30 \cdot 10^{-3} \text{ Ns m}^{-2}$  (bei  $37^\circ\text{C}$  bzw.  $313 \text{ K}$ )

für Serum  $0,94 \cdot 10^{-3} \text{ Ns m}^{-2}$  (bei  $23^\circ\text{C}$  bzw.  $296 \text{ K}$ )

[von  $23^\circ\text{C}$  bis  $30^\circ\text{C}$   $0,02 \cdot 10^{-3} \text{ Ns m}^{-2}/^\circ\text{C}$ ]

für Serum  $0,80 \cdot 10^{-3} \text{ Ns m}^{-2}$  (bei  $30^\circ\text{C}$  bzw.  $306 \text{ K}$ )

[von  $30^\circ\text{C}$  bis  $37^\circ\text{C}$   $0,015 \cdot 10^{-3} \text{ Ns m}^{-2}/^\circ\text{C}$ ]

für Serum  $0,695 \cdot 10^{-3} \text{ Ns m}^{-2}$  (bei  $37^\circ\text{C}$  bzw.  $313 \text{ K}$ )

für Blut  $4,00 \cdot 10^{-3} \text{ Ns m}^{-2}$  (bei  $23^\circ\text{C}$  bzw.  $296 \text{ K}$ )

$\sigma_K$  = Dichte des Körpers (z.B. Thrombozyt  $1,040 \text{ kg dcm}^{-3}$ )

$\sigma_\eta$  = Dichte des strömenden Mediums (z.B. Plasma  $1,030 \text{ kg dcm}^{-3}$ )

$v$  = Geschwindigkeit des Elementes ( $\text{m/s}$ )

$F_{V_K}$  = Füllvolumen des Zentrifugenkanals

V = Volumen des Körpers bzw. Elementes ( $\text{dcm} \cdot 10^3 = \text{Liter}$ )

m = Masse des Elementes bzw. Körpers ( $m = V \cdot \sigma = \text{kg}$ )

g = Erdbeschleunigung = 9,81 m/s

G = Gravitationskonstante  $6,6726 \cdot 10^{-12} \text{ m}^3 \text{ kg}^{-1} \text{ s}^{-2}$

$r_z = r_{\max}$  Abstand vom Zentrum der Rotation

$r_{z\text{StA(Ery)}}$  = Abstand vom Zentrum der Rotation Außenwand des Kanals

$r_{z\text{StM(Ery)}}$  = Abstand vom Zentrum der Rotation zur Mittelwand des Kanals

$r_{z\text{StI(Ery)}}$  = Abstand vom Zentrum der Rotation zur Innenwand des Kanals

$r_{\text{WBCA}}$  = Abstand vom Zentrum der Rotation zur Außenwand des Kanals

$r_{\text{WBCK}}$  = Abstand vom Zentrum der Rotation des Konus im Kanal

$r_{\text{WBCKI}}$  = Abstand vom Zentrum der Rotation zur Innenwand des Kanals

$r_{\text{TkrPIA}}$  = Abstand vom Zentrum der Rotation zur Außenwand des Kanals

$r_{\text{TkrPII}}$  = Abstand vom Zentrum der Rotation zur Innenwand des Kanals

Ery = Erythrozyt

WBC = white blood component (z.B. Monozyten oder Blutstammstellen)

TkrPI = Thrombozytenreiches Plasma

Tk = Thrombozyt

$a_r$  = Zentripetalbeschleunigung

$a_r = r \cdot \omega^2 = r \cdot (2 \pi f)^2$

$\omega$  = Winkelgeschwindigkeit =  $2 \pi f$  ( $f$  = Umlauffrequenz = Umdrehungszahl/60) [ $\text{s}^{-1}$ ]

$a_z$  = Zentripetalkraft  $\Rightarrow a_z = m \cdot r \cdot \omega^2 = m \cdot r \cdot (2 \pi f)^2$

$RT = N_A \cdot k \cdot T$

kT = thermische Konstante J K

p = Druck =  $1 \text{ N/m}^2 = 1 \text{ Pascal} = 10^{-5} \text{ bar}$  (1 Newton =  $\text{kg m/s}^2$ )  $\Rightarrow$

1 bar =  $10^5 \text{ Pa}$

1 at = 0,980665 bar

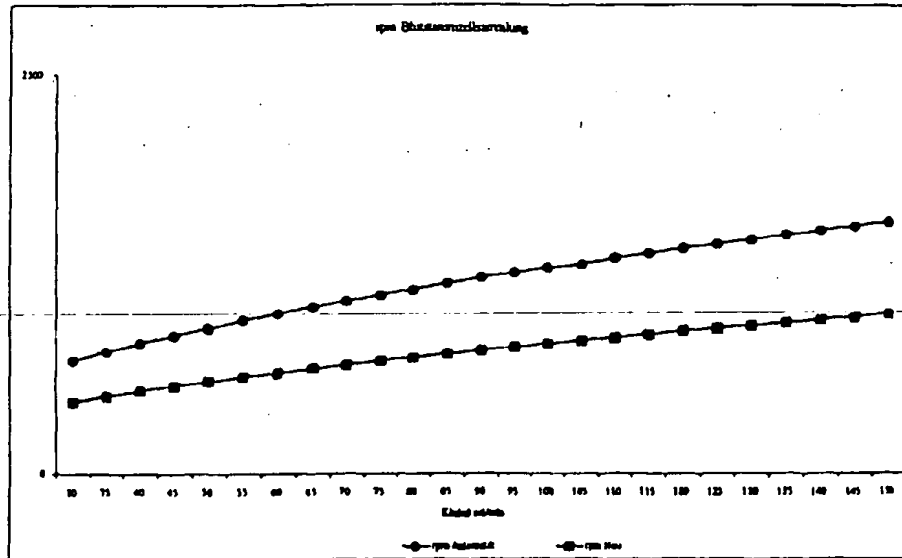
1 atm = 1013,25 mbar

$\Rightarrow$

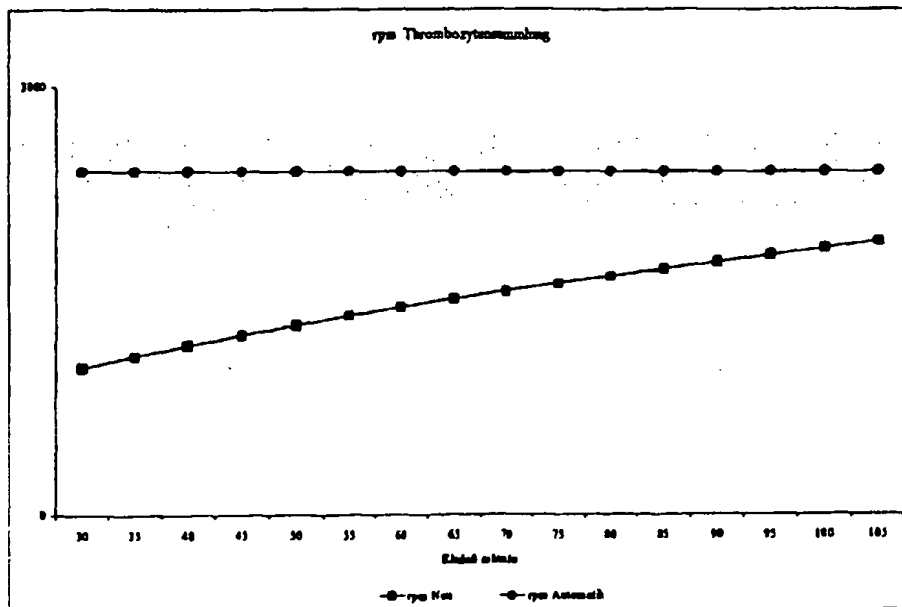
$1 \text{ N/m}^2 = 1,02 \cdot 10^{-5} \text{ at}$

$1 \text{ N/m}^2 = 0,07 \cdot 10^{-5} \text{ at}$

Graphik 1



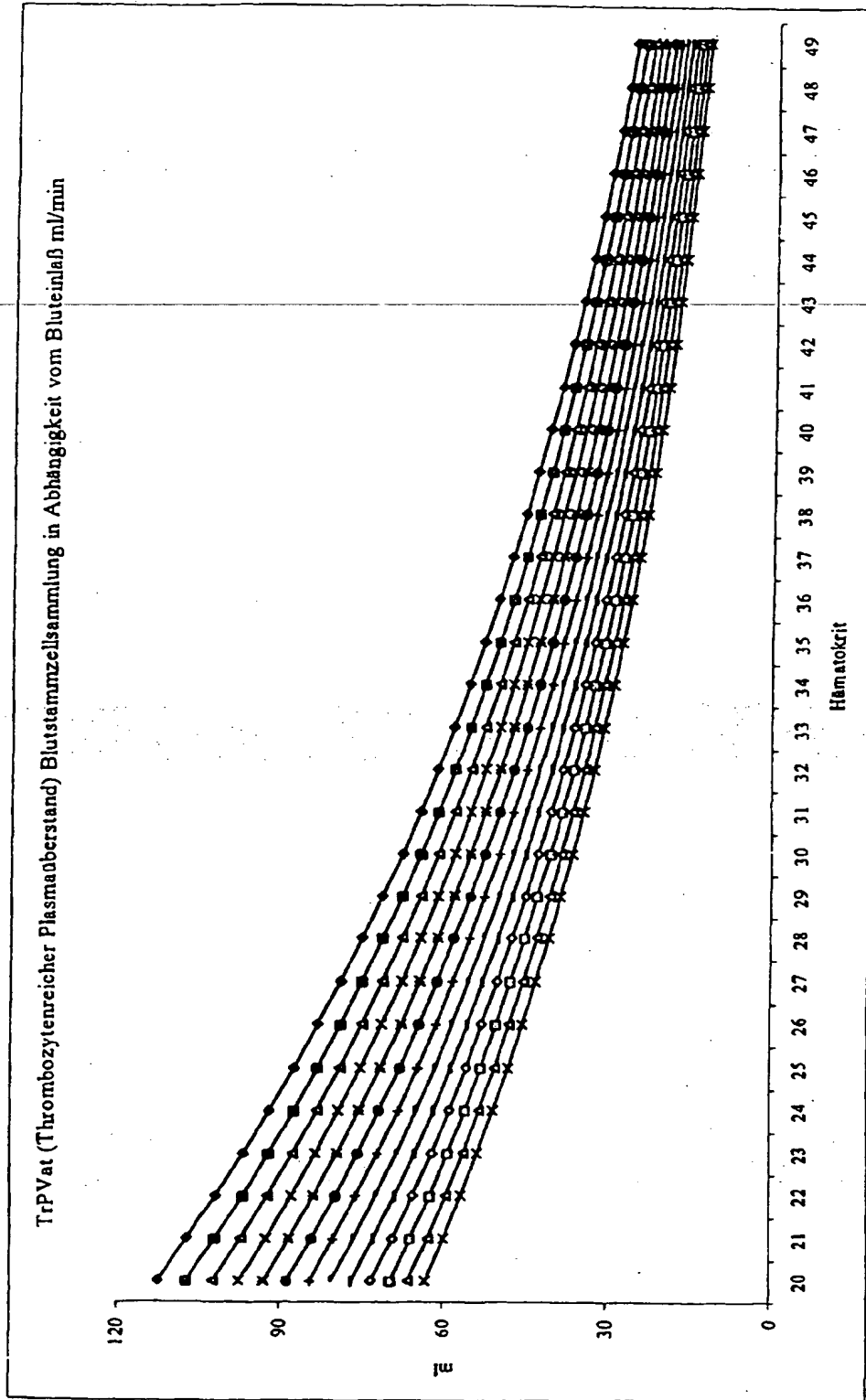
Graphik 2



In den Graphiken 1 und 2 ist der Unterschied zwischen den aktuellen Umdrehungsgeschwindigkeiten, welche für alle Zuflußvolumen gleich sind und den neu berechneten dargestellt.

In den Graphik 3 und 4 sind in Abhängigkeit von den Einlaßflüssen, dem Hämatokrit und der Anzahldicke der Komponenten, die Volumen-Minuten des Pumpen P.3 bzw. P.4 dargestellt.

Graphik 3



5

10

15

20

25

30

35

40

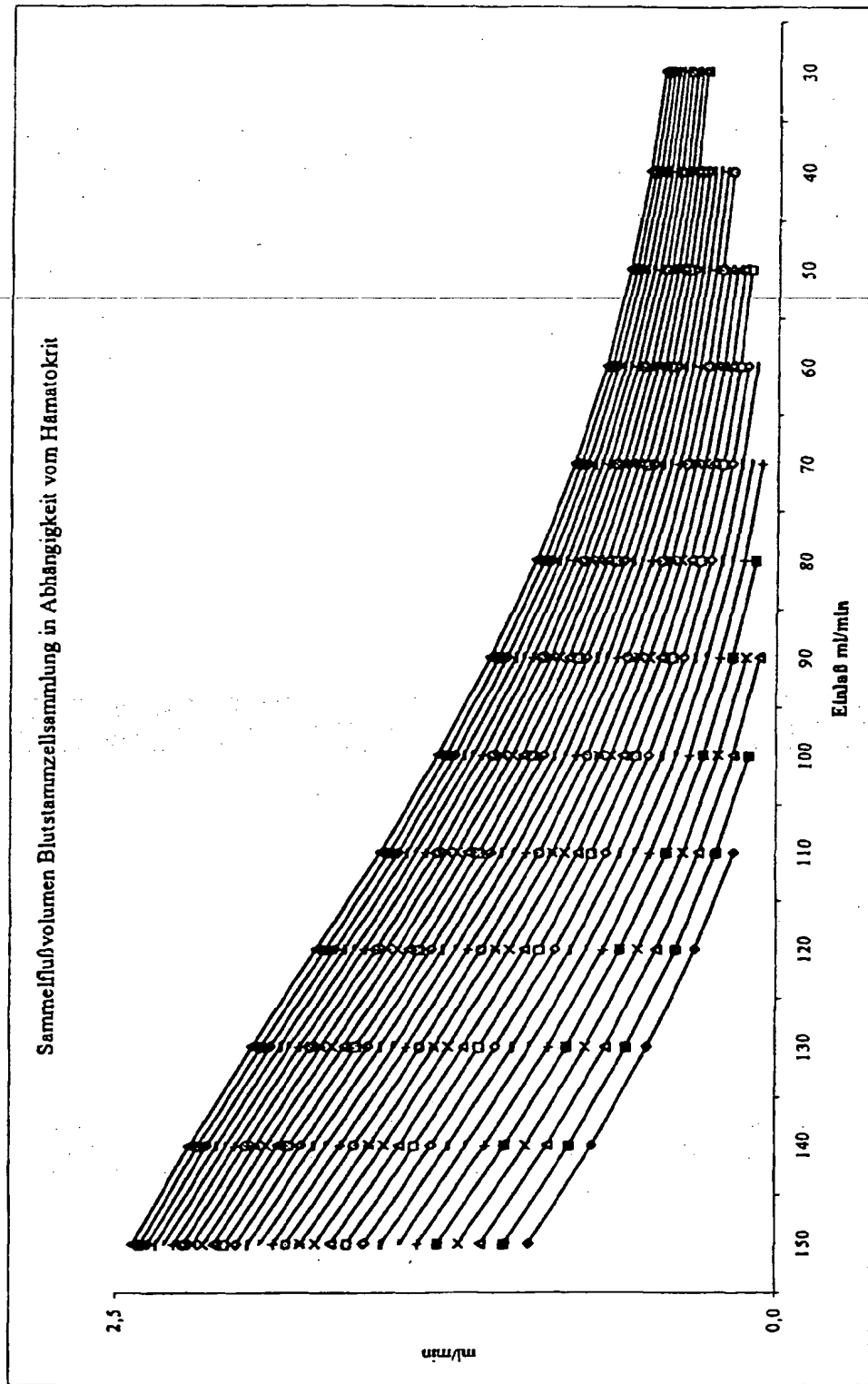
45

50

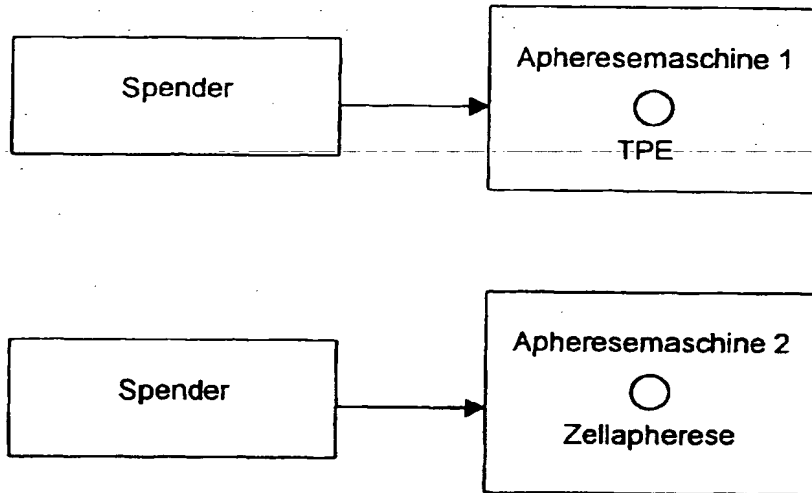
55



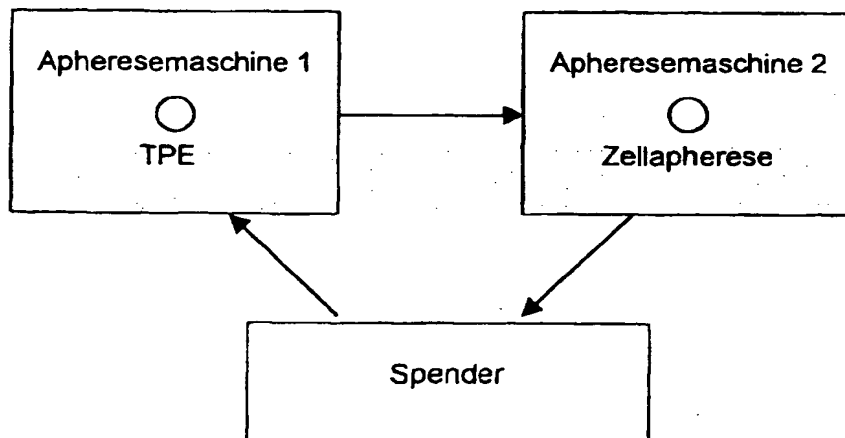
Graphik 4



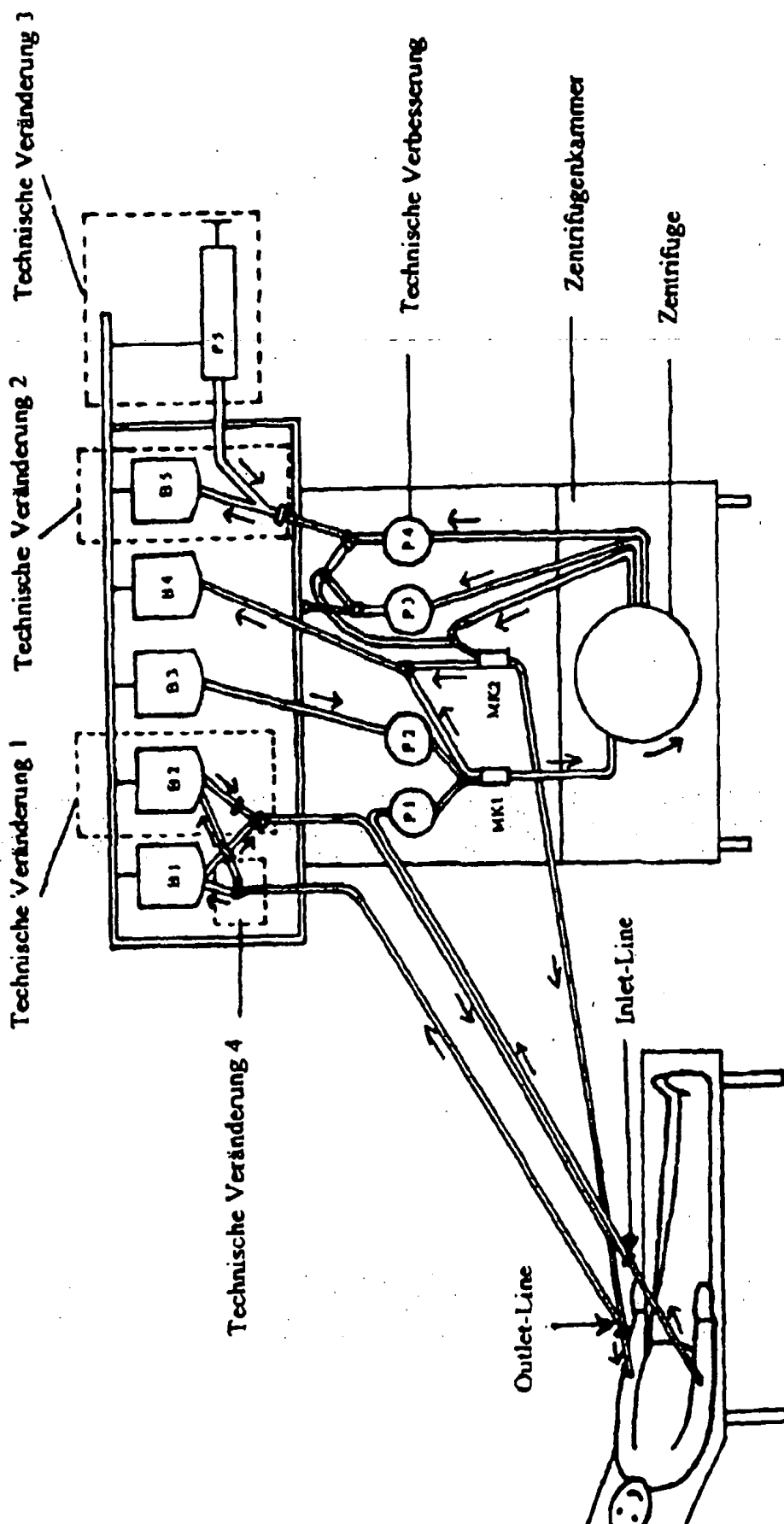
Fluß – Diagramm 1  
Sequentielles Verfahren



Fluß – Diagramm 2  
Kombiniertes Verfahren



Skizze 1



# Detailskizzen für die zusätzlichen Schläuche und Beutelanschlüsse

Zu Punkt 12

Die technische Veränderung 4, ist gekennzeichnet durch eine Schlauch-  
verbindung für die Entlüftung über den Rückflußschlauch zu B 1 bzw. B 2  
über MK 2, wie im nebenstehenden Kasten (Neu) dargestellt.

Nach B 1 (NaCl 0,9%) von MK2

Nach B 2 (Humanalbumin 5%) von MK2

Teil A/B

Neu

Teil B/A

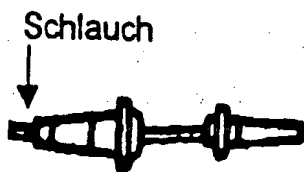
Teil C

Teil C

Verbindungsstelle

Von MK2

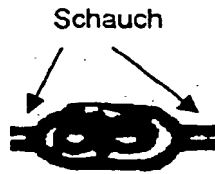
Anstecknadel zur Lösungsrückführung (Teil B) und Tropfkammer (Teil A)



Teil B

Teil A

Rasterkemme (Teil C)



Zu Punkt 9

Die technische Veränderung 1, ist gekennzeichnet durch eine Schlauch-  
verbindung zu B1 bzw. neuen B 2, wie im nebenstehenden Kasten (Neu)  
dargestellt.

Von B 1 (NaCl 0,9%) nach

P1 Von B 2 (Humanalbumin 5%) nach P1

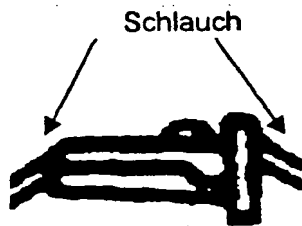
Neu Teil E/D

Teil F

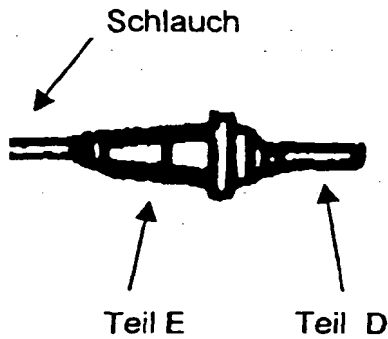
Verbindungsstelle

Nach P1

Rollklemme (Teil F)



Ansteckverbindung zur Lösungsentnahme (Teil D) und Tropfkammer (Teil E)



Zu Punkt 10

Die technische Veränderung 2, ist gekennzeichnet durch eine Schlauchverbindung zu B 5 und zur Perfusorpumpe, wie im nebenstehenden Kasten (Neu) dargestellt.

Nach B 5 durch Sammelschlauch

Von P 5 durch ACD-Perfusorschlauch

Neu

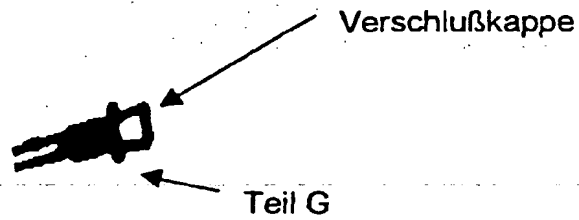
Teil G

Teil D

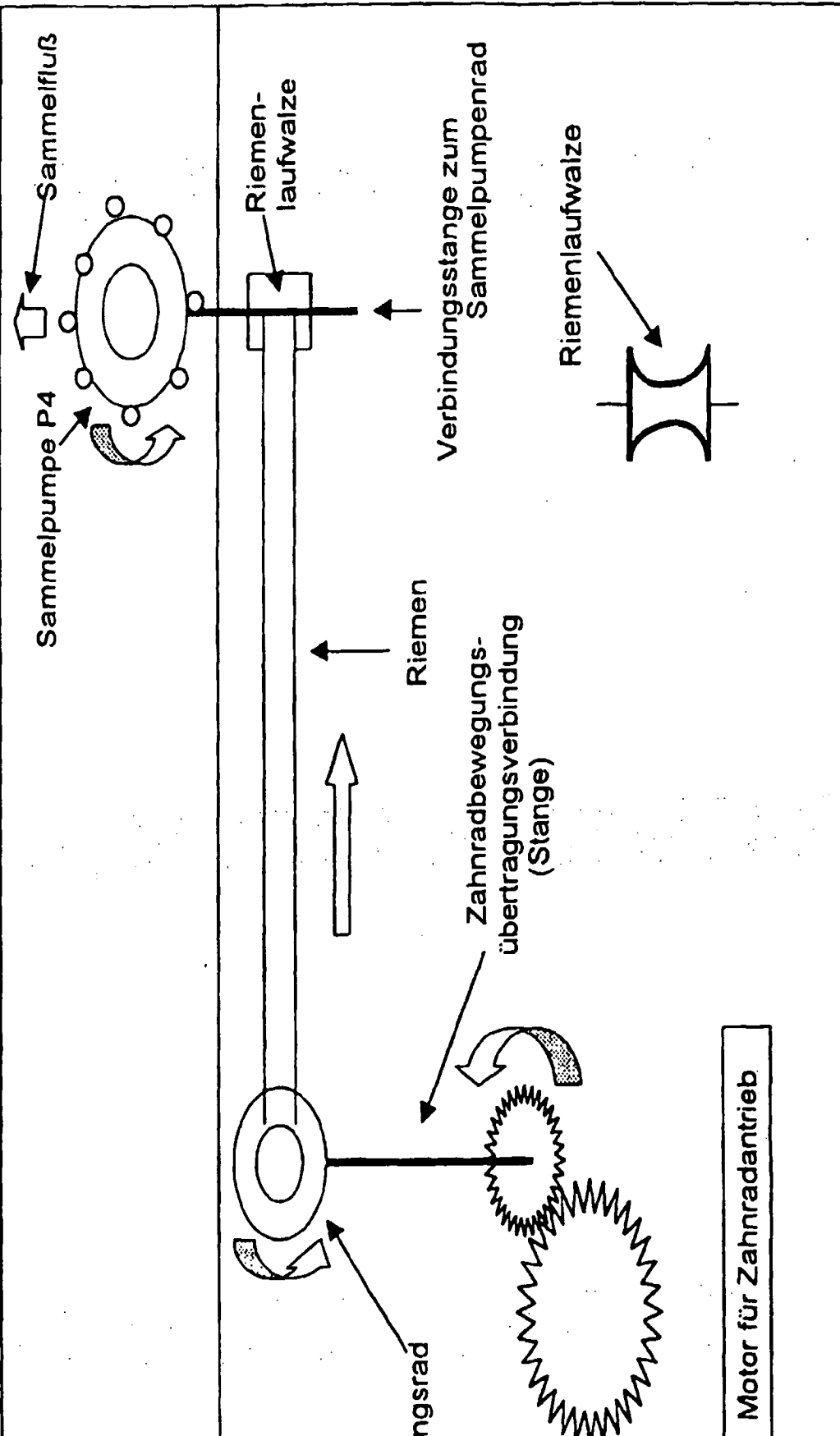
Verbindungsstelle

Von P5

Leuer-Anschluß (Teil G) am Ende von Schlauch A zur Konnektierung von  
z.B. Perfusorspritze



Detailskizze kennzeichnet Riemenantrieb der Pumpe P 4 (=Sammelpumpe)





## Zentrifugalkraft in Abhängigkeit vom Drehachsenabstand der Zentrifuge

Tabelle 11

az A1	az A2	az A3	az A4
Zentrifugalkraft	Zentrifugalkraft	Zentrifugalkraft	Zentrifugalkraft
100	99	102	96
150	148	153	144
199	196	203	191
249	246	254	238
299	295	305	286
350	344	356	334
399	393	406	382
450	444	458	430
499	492	508	477
549	541	559	525
599	590	610	573
649	640	661	621
700	690	713	669
750	739	764	717
800	788	814	765
849	836	864	811
899	886	915	860
949	935	966	907
999	985	1018	956

az A1	az A2	az A3	az A4
Zentrifugalkraft	Zentrifugalkraft	Zentrifugalkraft	Zentrifugalkraft
1049	1034	1068	1003
1100	1084	1120	1052
1149	1133	1170	1099
1200	1182	1222	1147
1249	1230	1271	1194
1299	1280	1322	1242
1349	1330	1374	1290
1398	1378	1424	1337
1448	1427	1474	1385
1499	1477	1526	1433
1547	1524	1575	1479
1599	1576	1628	1529
1649	1625	1679	1577
1697	1672	1728	1623

### Patentansprüche

- Verfahren zur Sammlung von spezifischen Blutkomponenten bei kontinuierlichen, laminaren Strömungsverhältnissen, wobei dem Patienten mittels einer ersten Leitung Blut entnommen und einer der Separation der Blutkomponenten dienenden Zentrifuge zugeführt und über eine Rückföhrleitung dem Patienten Blut mit der Entnahme-Zuflußrate zurückgeföhrt wird, wobei die Separation bestimmt wird durch den Geometriefaktor der Zentrifuge, durch die Rotationsgeschwindigkeit der Zentrifuge und die Positionierung der Entnahmeleitung an der Zentrifuge, und wobei charakteristisch für die Separation einzelner bestimmter Blutkomponenten ein Trennungsoptimierungskoeffizient  $T_{OK}$  ist, **dadurch gekennzeichnet, daß** zur Sammlung von Blutstammzellen bzw. mononuklearen Zellen der Trennungsoptimierungskoeffizient  $T_{OK}$  zwischen 140 und 190, vorzugsweise bei ca. 176 liegt, und/oder daß bei Sammlung von Thrombozyten bei Blutflußgeschwindigkeiten zwischen 30 und 100 ml/min der Trennungsoptimierungskoeffizient zwischen 600 und 700, vorzugsweise bei ca. 649 liegt.

- Verfahren nach Anspruch 1, wobei vor der Blutentnahme von einem Patienten das Schlauchsystem mit einer in

## EP 0 976 414 A2

stem zu entfernende Luft in einen Behälter B4 gepumpt wird, und wobei bei Beginn der Blutentnahme über eine erste Pumpe P1 das Blut des Patienten entnommen und in einer Mischkammer MK1 in einem definierten Verhältnis mit einem Antikoagulanzen versetzt wird, **dadurch gekennzeichnet, daß** ein zusätzlicher Behälter B2 mit Humanalbumin-Lösung parallel geschaltet zum Behälter B1 mit physiologischer Kochsalzlösung angeordnet wird, wobei zunächst eine Primäerspülung mit diesem Humanalbumin und anschließend in an sich bekannter Weise eine Spülung mit physiologischer Kochsalzlösung vorgenommen wird, wobei der Großteil der Lösung der Primäerspülung entfernt wird.

3. Verfahren nach Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet, daß** das für die Primäerspülung verwendete Humanalbumin in den Behälter B2 zurückgepumpt wird.
4. Verfahren, insbesondere nach Anspruch 1 oder 2, wobei die separierten definierten Blutkomponenten aus der Kammer der Zentrifuge über eine Pumpe P4 abgepumpt und einem Sammelbehälter zugeführt werden, **dadurch gekennzeichnet, daß** der Pumpe P4 eine Abzweigung nachgeordnet ist, die einerseits in den Sammelbehälter B5 für die separierten Blutkomponenten führt und in die andererseits die von einer zusätzlichen Pumpe P5 kommende Leitung einmündet, wobei über die Pumpe P5 während des Sammelvorgangs ein Antikoagulanzen zugeführt wird, wobei gleichzeitig die dem Patienten zugeführte Menge an Antikoagulanzen reduziert wird.
5. Verfahren nach Anspruch 4, **dadurch gekennzeichnet, daß** die Dosierung des über die Pumpe P5 zugeführten Antikoagulanzen in Abhängigkeit von dem Sammelvolumen zugeführt wird, welches von der Pumpe P4 aus der Zentrifugenkammer zum Sammelbehälter B5 gepumpt wird.
6. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 5, umfassend eine Pumpe P4 zum Abpumpen der separierten Blutkomponenten aus der Zentrifugenkammer zu einem Sammelbehälter B5, **dadurch gekennzeichnet, daß** die Pumpe P4 über einen Riemenantrieb angetrieben ist.

(19)



Eur päisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets



(11)

**EP 0 976 414 A3**

(12)

## EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(88) Veröffentlichungstag A3:  
17.05.2000 Patentblatt 2000/20

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>: **A61M 1/38**

(43) Veröffentlichungstag A2:  
02.02.2000 Patentblatt 2000/05

(21) Anmeldenummer: 99104790.3

(22) Anmeldetag: 10.03.1999

(84) Benannte Vertragsstaaten:  
**AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU  
MC NL PT SE**  
Benannte Erstreckungsstaaten:  
**AL LT LV MK RO SI**

(30) Priorität: 10.03.1998 DE 19810195

(71) Anmelder:  
**Salinger, Reinhard Dr. med.  
90542 Eckental (DE)**

(72) Erfinder:  
**Salinger, Reinhard Dr. med.  
90542 Eckental (DE)**

(74) Vertreter:  
**Schneck, Herbert, Dipl.-Phys., Dr. et al  
Rau, Schneck & Hübner  
Patentanwälte  
Königstrasse 2  
90402 Nürnberg (DE)**

(54) **Verfahren und Vorrichtung zur Sammlung und Weiterverarbeitung von spezifischen Blutkomponenten bei kontinuierlichen laminaren Strömungsverhältnissen**

(57) Bei einem Verfahren zur Sammlung von spezifischen Blutkomponenten bei kontinuierlichen, laminaren Strömungsverhältnissen, wobei dem Patienten mittels einer ersten Leitung Blut entnommen und einer der Separation der Blutkomponenten dienenden Zentrifuge zugeführt und über eine Rückführleitung dem Patienten Blut mit der Entnahme-Zuflußrate zurückgeführt wird, wobei die Separation bestimmt wird durch den Geometriefaktor der Zentrifuge, durch die Rotationsgeschwindigkeit der Zentrifuge und die Positionierung der Entnahmeleitung an der Zentrifuge, und wobei charakteristisch für die Separation einzelner bestimmter Blutkomponenten ein Trennungsoptimierungskoeffizient  $T_{OK}$  ist, ist vorgesehen, daß zur Sammlung von Blutstammzellen bzw. mononuklearen Zellen der Trennungsoptimierungskoeffizient  $T_{OK}$  zwischen 140 und 190, vorzugsweise bei ca. 176 liegt, und/oder daß bei Sammlung von Thrombozyten bei Blutflußgeschwindigkeiten zwischen 30 und 100 ml/min der Trennungsoptimierungskoeffizient zwischen 600 und 700, vorzugsweise bei ca. 649 liegt.



Europäisches  
Patentamt

**EUROPÄISCHER TEILRECHERCHENBERICHT,**  
der nach Regel 45 des Europäischen Patent-  
übereinkommens für das weitere Verfahren als  
europäischer Recherchenbericht gilt

Nummer der Anmeldung

EP 99104790.3

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			EP 99104790.3
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl. 6)
A	EP 0668443 A1 (STÖCKERT INST.) 23 August 1995, Zusammenfassung, Spalte 4, Zeilen 36-49. --	6	A 61 M 1/38
D, A	EP 0654277 A1 (COBE LAB.) 24 Mai 1995, ganzes Dokument. --	-	
D, A	DE 3828618 C2 (COBE LAB.) 05 November 1992, ganzes Dokument. --	-	
D, A	DE 3828120 A1 (COBE LAB.) 02 März 1989, ganzes Dokument. ----	-	
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl. 6)
			A 61 M
<b>UNVOLLSTÄNDIGE RECHERCHE</b>			
<p>Nach Auffassung der Recherchenabteilung entspricht die vorliegende europäische Patentanmeldung den Vorschriften des Europäischen Patentübereinkommens so wenig, daß es nicht möglich ist, auf der Grundlage einiger Patentansprüche sinnvolle Ermittlungen über den Stand der Technik durchzuführen.</p> <p>Vollständig recherchierte Patentansprüche: 6 Unvollständig recherchierte Patentansprüche: - Nicht recherchierte Patentansprüche: 1-5 Grund für die Beschränkung der Recherche:</p> <p>Die Ansprüche 1-5 sind in Anwendung des Artikels 52(4) EPÜ nicht patentierbar. Sie betreffen ein therapeutisches Verfahren zur Behandlung des menschlichen oder des tierischen Körpers.</p>			
Recherchenort WIEN		Abschlußdatum der Recherche 14-07-1999	Erfinder LUDWIG

**KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTEN**

X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet  
Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie

A : technologischer Hintergrund

O : nichtschriftliche Offenbarung

P : Zwischenliteratur

T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze

E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist  
D : in der Anmeldung angeführtes Dokument  
L : aus andern Gründen angeführtes Dokument

& : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument

# ANHANG ZUM EUROPÄISCHEN RECHERCHENBERICHT ÜBER DIE EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG NR. EP 99104790.3

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obigen genannten europäischen Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben.  
 Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der EPIDOS-INPADOC-Datei am 21. 7.1999  
 Diese Angaben dienen zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

In Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP A1 668443	23-08-1995	DE C0 59404780	22-01-1998
		EP B1 668443	10-12-1997
		US A 5499907	19-03-1996
EP A1 654277	24-05-1995	AU A1 75723/94	11-05-1995
		AU B2 685495	22-01-1998
		CA AA 2133913	22-04-1995
		CA C 2133913	02-02-1999
		JP A2 7178162	18-07-1995
		US A 5496265	05-03-1996
		US A 5712798	27-01-1998
		US A 5658240	19-08-1997
		AU A1 68861/94	02-03-1995
		AU B2 675547	06-02-1997
		CA AA 2129167	24-02-1995
		EP A1 649663	26-04-1995
		JP A2 7163656	27-06-1995
		US A 5437624	01-08-1995
		US A 5421812	06-06-1995
		US A 5676645	14-10-1997
		US A 5817042	06-10-1998
		CA AA 2100199	11-01-1994
		CA C 2100199	19-05-1998
		DE C0 69313212	25-09-1997
		DE T2 69313212	02-01-1998
		EP A1 580299	26-01-1994
		EP B1 580299	20-08-1997
		JP A2 6335524	06-12-1994
		US A 5605842	25-02-1997
		US A 5611997	18-03-1997
		AU A1 61521/96	24-12-1996
		CA AA 2219084	12-12-1996
		EP A1 833673	08-04-1998
		WD A1 9639209	12-12-1996
DE C2 3828618	05-11-1992	AU A1 21084/88	02-03-1989
		AU B2 594248	01-03-1990
		AU A1 46991789	26-04-1990
		AU B2 610029	09-05-1991
		CA A1 1325162	14-12-1993
		DE A1 3828618	16-03-1989
		FR A1 2619923	03-03-1989
		FR B1 2619923	29-04-1994
		GB A0 8820084	28-09-1988
		GB A1 2208927	19-04-1989
		GB A0 8916184	31-08-1989
		GB A1 2219083	29-11-1989
		GB B2 2208927	19-02-1992
		GB B2 2219083	19-02-1992
		IT A0 8867772	23-08-1988
		IT A 1223785	29-09-1990
		JP A2 1097437	14-04-1989
		JP B4 3069532	01-11-1991
		US A 4810090	07-03-1989
DE A1 3828120	02-03-1989	AU A1 21087/88	23-02-1989
		AU A1 40258/89	07-12-1989
		AU B2 593424	08-02-1990
		AU B2 612889	18-07-1991
		CA A1 1327555	08-03-1994
		DE C2 3828120	20-02-1992
		FR A1 2619508	24-02-1989
		FR A1 2622803	12-05-1989
		FR B1 2622803	13-03-1992
		FR B1 2619508	10-10-1997
		GB A0 8619590	21-09-1988
		GB A1 2208814	19-04-1989
		GB B2 2208814	27-11-1991
		IT A0 8867767	18-08-1988
		IT A 1223780	29-09-1990
		JP A2 1170469	05-07-1989
		JP B2 2608932	14-05-1997
		US A 4850995	25-07-1989

## 1. Centrifuge rotational speed (RPM)

(Graphics 1 and 2)

In order to receive an optimal collection from specific cell components, the above mentioned physical and biophysical realizations were consulted. It is to be considered necessarily the number density  $\mu$  l and/or /ml within the centrifuges so that an optimal relationship of the cell components which can be collected to that to collecting cell components is not present, here must in particular the sedimentation speeds of the individual components, as well as the time, they are exposed to which the centrifugal energy, be considered. Generally

$$\begin{aligned} G &= r \cdot [U_{\min}^{-1}/1000]^2 \cdot 11,18 \text{ m s}^{-2} \Rightarrow \\ a_r &= r \cdot \omega^2 = r \cdot (2\pi f)^2 \Rightarrow \\ a_z &= m \cdot r \cdot \omega^2 = m \cdot r \cdot (2\pi f)^2 \text{ for the centrifugal effect.} \end{aligned}$$

For the centrifugal effect of a centrifuge, distance of the Zentrifugenchase constantly, the g-number and the centrifuge duration stand in reciprocal relationship, so that with doubling of the centrifuge duration the g-number can be halved and in reverse. The factor  $11,18 \text{ m s}^{-2}$  is derived from acceleration due to gravity. In order to reach this optimization, must o.g. Forces and speeds, which prevail within the centrifuge, to be determined as exactly as possible, from which a separation optimization coefficient =  $T_{OK}$  or also separate ion factor SF for the respective cell components which can be collected can be determined.

$$T_{OK} = [r \cdot (2\pi f)^2 \cdot t \cdot F_{v_K} \cdot l/t] / [GF/g]$$

1.1. The collection of Blutstammzellen and/or mononukleären cells = MNZ is characterized by it that their interval for  $T_{OK(MNZ)} = SF$  between [ 140-190 ] lies, preferably with

$$T_{OK(MNZ)} = SF = 176.$$

At present for the collection of these cell components mindest of values is recommended equal  $T_{OK(MNZ)} = SF$  of [400-500] 500.

1.2. The collection of Thrombozyten, at blood speeds between 30 and 100 ml/min, is characterized by it that the interval for  $T_{OK(MNZ)} = SF$  between [600-700] lies, preferably with

$$T_{OK(MNZ)} = SF = 649.$$

At present for the collection of this cell component minimum values are used equal  $T_{OK(MNZ)} = SF$  of [1000-3700].

Since the  $T_{OK} = SF$  is a constant, the revolution frequency (RPM) of the centrifuge depends and by the formula of 1 characterized on the total inlet ( $GF_{\text{ml/min}}$ ), volume input (ml/min) into the respective centrifuge chamber  $\Rightarrow$

$$\text{RPM} = a \cdot GF_{\text{ml/min}}^{b1} \text{ (a and b1 real numeric values, which are different with}$$